



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

**Aislamiento y enriquecimiento *in vitro* de células madre
espermatogoniales de alpaca (*Vicugna pacos*) y
caracterización de co-cultivos con células de Sertoli**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Bióloga Genetista
Biotecnóloga

AUTOR

Catherine Claudia SULCA CERVAN

ASESOR

Dra. Martha Esther VALDIVIA CUYA

Lima, Perú

2021



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Sulca, C. (2021). *Aislamiento y enriquecimiento in vitro de células madre espermatogoniales de alpaca (Vicugna pacos) y caracterización de co-cultivos con células de Sertoli*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Genética y Biotecnología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Hoja de metadatos complementarios

Código ORCID del autor	0000-0002-8806-5102
DNI o pasaporte del autor	47633753
Código ORCID del asesor	0000-0002-8301-5536
DNI o pasaporte del asesor	06449624
Grupo de investigación	BIOTRA
Agencia financiadora	Perú Universidad Nacional Mayor de San Marcos Fondo de promoción de Trabajo de Tesis del Vicerrectorado de Investigación Aprobado con Código N° B18100194, con RR N° 05969-R- 18.
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	- CIENCIAS BIOLOGICAS UNMSM, LIMA: 12°03'35.2"S 77°04'55.7"W - CAMAL MUNICIPAL DE HUANCAVELICA 12°47'25.4"S 75°02'13.0"W
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2018-2020
Disciplinas OCDE	Biotechnología Reproductiva https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.08



UNIVERSIDAD NACIONAL

MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA GENETISTA BIOTECNÓLOGA
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS)**

Siendo las 10:15 horas del 24 de marzo de 2021, en el Salón de Grados Virtual, mediante la herramienta MEET de Google con enlace <https://meet.google.com/jfo-osqn-rez>, el jurado formado por los profesores que suscriben, dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga** de **CATHERINE CLAUDIA SULCA CERVAN**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° UNMSM-20210007198, la titulando expuso su tesis: **“AISLAMIENTO Y ENRIQUECIMIENTO *in vitro* DE CÉLULAS MADRE ESPERMATOGONIALES DE ALPACA (*Vicugna pacos*) Y CARACTERIZACIÓN DE CO-CULTIVOS CON CÉLULAS DE SERTOLI**”, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 19, calificativo: APROBADO CON MÁXIMOS HONORES

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga** a **CATHERINE CLAUDIA SULCA CERVAN** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 13:10 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 24 de marzo de 2021.

Mg. PATRICIA WOLL TOSO
(PRESIDENTA)



Firmado digitalmente por VALDIVIA
CUYA Martha Esther FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 24.03.2021 12:56:37 -05:00

Dra. MARTHA VALDIVIA CUYA
(ASESORA)



Firmado digitalmente por PINO
GAVINO Jose Luis Rafael FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 24.03.2021 12:54:46 -05:00

Blgo. JOSE LUIS PINO GAVIÑO
(MIEMBRO)

Mg. GUILLERMO ALVAREZ BEJAR
(MIEMBRO)

DEDICATORIA

A quienes siguen adelante a pesar de los altibajos, a mi familia y amigos quienes me acompañaron en todo este trayecto de investigación científica.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por su bendición, acompañarme y cuidarme siempre.

A mis padres, quienes día a día se esfuerzan para que no me falte nada; a mis hermanas y primo hermano, quienes me enseñan con ejemplos el sentido de la responsabilidad, me aconsejan y brindan su apoyo en todo momento. Un beso eterno mamá.

A mis maestros y colegas del Laboratorio de Fisiología de la Reproducción de mi querida Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Agradezco a la doctora Martha Valdivia Cuya por permitirme formar parte de este gran grupo, por su apoyo constante, sus enseñanzas y ser un ejemplo de lucha; y a Zezé Bravo Gutiérrez, quien a pesar de su corta edad demuestra gran suficiencia y seguridad, gracias por su amistad. De manera muy especial agradezco a mi amiga y compañera de tesis Maria del Pilar todo el tiempo de trabajo compartido, aprendimos juntas en este largo camino. A cada uno de los chicos del laboratorio, mi amiga Tania, Stefanny, Ema, Luz, Rubén, Carmen, quienes contribuyeron con mi investigación brindándome su ayuda, compartiendo sus conocimientos y haciendo que cada una de las horas de trabajo hayan sido amenas y muy felices. Gracias por regalarme su amistad.

A todos quienes fueron una voz de aliento y me animaron a ser constante durante este procedimiento. Gracias Renzo.

Finalmente agradezco al Programa de promoción de Tesis de pregrado N°B18100194, aprobado con RR N°05969-R-18. Gracias por darme la oportunidad de avanzar en mi camino de la ciencia.

ÍNDICE

DEDICATORIA	1
AGRADECIMIENTOS	2
ÍNDICE DE FIGURAS	7
INDICE DE TABLAS	9
ÍNDICE DE GRÁFICOS	10
ABREVIATURAS	11
RESUMEN	13
SUMMARY	15
INTRODUCCIÓN	17
MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL	18
1. Camélidos sudamericanos: La alpaca (<i>Vicugna pacos</i>)	18
1.1. Aspectos generales.....	18
1.2. Aspectos reproductivos.....	19
1.3. Razas de alpaca	20
2. Células testiculares.....	21
2.1. Células de la línea germinal.....	21
2.2. Células de Sertoli	44
3. Interacción células de Sertoli- células de la línea germinal	58
4. Cultivo celular.....	60
4.1. Parámetros reguladores.....	60
4.2. Medios de cultivo	61
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	63
1. Hipótesis	63
2. Objetivos	63

2.1. Objetivo General.....	63
2.2. Objetivos Específicos	63

MATERIALES Y MÉTODOS 64

1. Materiales	64
1.1. Material biológico	64
1.2. Material de laboratorio	64
2. Métodos.....	68
2.1. Colección de las muestras	68
2.2. Aislamiento de células testiculares- células madre espermatogoniales	68
2.3. Purificación y enriquecimiento de las células madre espermatogoniales (SSC) mediante la gradiente de densidad Percoll	69
2.4. Determinación de la viabilidad y concentración celular.....	70
2.5. Fijación celular.....	70
2.6. Cultivo de SSC control y post percoll.....	71
2.7. Aislamiento y cultivo de células de Sertoli	71
2.8. Co-cultivo de las SSC enriquecidas con células de Sertoli	72
2.9. Identificación de las SSC mediante el marcaje con el conjugado DBA-FITC	72
2.10. Identificación de las células de Sertoli.....	74
2.11. Análisis estadísticos.....	74

RESULTADOS 75

1. Evaluación de parámetros espermáticos	75
2. Evaluación de la viabilidad y concentración de las SSC de la suspensión de células testiculares (Grupo Control)	75
3. Evaluación de las distintas fases formadas en las columnas de Percoll.....	76
4. Evaluación de la viabilidad, concentración y enriquecimiento de las células purificadas mediante las gradientes de Percoll.....	77
5. Comparación entre las viabilidades inicial y post percoll	79
6. Comparación de los porcentajes de SSC del Grupo Control y Post Percoll evaluados mediante Citometría de Flujo	81
7. Comparación de los porcentajes de SSC del Grupo Control y Post Percoll evaluados mediante Microscopía de fluorescencia	83
8. Comparación porcentual de las SSC de los Cultivos Grupo Control y Post Percoll evaluados mediante Citometría de Flujo	86
9. Comparación porcentual de las SSC de los Cultivos Grupo Control y Post Percoll evaluados mediante Microscopía de Fluorescencia	88

10.	Comparación de Cultivos Control y Post Percoll	90
11.	Caracterización de los cultivos <i>in vitro</i> de células de Sertoli.....	91
12.	Co-cultivos de células de Sertoli con SSC purificadas por las gradientes de Percoll	92
DISCUSIÓN		98
CONCLUSIONES		113
RECOMENDACIONES		114
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		115
ANEXOS		145
Anexo 1: Procesamiento de las muestras biológicas		145
Anexo 2: Parámetros espermáticos de las 20 muestras testiculares evaluadas de alpaca (<i>Vicugna pacos</i>).....		148
Anexo 3: Viabilidades y Concentraciones iniciales y post percoll de las células testiculares de los 20 pares de muestras trabajadas		149
Anexo 4: Prueba de normalidad de viabilidades inicial y post percoll de los 20 pares de muestras testiculares de alpaca trabajados.....		149
Anexo 5: Estadístico de prueba Wilcoxon para demostrar si existe o no diferencia significativa entre las medias de la viabilidad inicial y post percoll		150
Anexo 6: Comparación de medias de las poblaciones celulares sDBA+, wDBA+ y DBA- entre los grupos Control y Post Percoll, usando Prueba T para muestras relacionadas - Evaluación por Citometría de Flujo		150
Anexo 7: Comparación de medias de las poblaciones celulares sDBA+, wDBA+ y DBA- entre los grupos Control y Post Percoll, usando Prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas - Evaluación por Microscopía de Fluorescencia.....		152
Anexo 8: Comparación de medias de las poblaciones celulares sDBA+, wDBA+ y DBA- entre los grupos Cultivo Control 8d y Cultivo Post Percoll 8d, usando Prueba T para muestras relacionadas - Evaluación por Citometría de Flujo.....		153
Anexo 9: Comparación de medias de las poblaciones celulares sDBA+, wDBA+ y DBA- entre los grupos Cultivo Control 8d y Cultivo Post Percoll 8d, usando Prueba T y Prueba de Wilcoxon - Evaluación por Microscopía de Fluorescencia.....		154
Anexo 10: Comparación de medias de las poblaciones celulares sDBA+ entre los grupos		

Control vs Cultivo Control 8d y Percoll vs Cultivo Post Percoll 8d - Evaluación por Citometría de Flujo	156
Anexo 11: Comparación de medias de las poblaciones celulares sDBA+ entre los grupos Control vs Cultivo Control 8d y Percoll vs Cultivo Post Percoll 8d - Evaluación por Microscopía de Fluorescencia	157

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Células del epitelio seminífero (Fuente: Developmental Biology, 6th edition, Gilbert SF. 2000).....	22
Figura 2. Representación esquemática de la espermatogénesis en roedores (A) y humanos (B) (Fuente: Waheeb & Hofmann 2011).....	25
Figura 3. Comparación de los grupos de células madre y producción de espermatozoides en el ratón, monos y el hombre (Fuente: Fayomi & Orwig 2018)	26
Figura 4. Morfología de las células espermatogoniales indiferenciadas (Aund) y diferenciadas (tipo A1, A2, A3, B1 y B2) del padrillo (caballo semental destinado a la reproducción) (Fuente: Costa, G. M. et al. 2012).....	27
Figura 5. Nicho de las SSC (Fuente: Lord, T., & Oatley, J. M. (2017)	30
Figura 6. Ilustración de las uniones estrechas entre células de Sertoli que dividen el epitelio seminífero en un compartimiento basal y otro adluminal (Fuente: Fawcett DW en Handbook of Physiology, 1975).....	46
Figura 7. Muestras biológicas. A la izquierda se observa la caja de envío donde son transportadas las muestras de trabajo (testículos de alpaca). A la derecha, los pares de testículos limpiados y lavados con suero.....	64
Figura 8. Formación del anillo de SSC en las gradientes de Percoll señaladas mediante flechas.....	70
Figura 9. Cultivos celulares a 37°C.....	71
Figura 10. Seguimiento de los cultivos celulares.....	71
Figura 11. Evaluación por microscopía de fluorescencia. Células strong (sDBA+) con fuerte fluorescencia (flechas celestes), células weak (wDBA+) con débil fluorescencia (flechas negras) y células sin fluorescencia (DBA-) (flecha roja)	73
Figura 12. Evaluación por citometría de flujo. A la izquierda se observa el ploteo del total de células testiculares, con la selección de las células redondas en recuadro verde. A la derecha se muestra la clasificación de la población de las células redondas seleccionadas según la intensidad de su fluorescencia. A. strong DBA+ (sDBA+); B. weak DBA+ (wDBA+); C. células sin afinidad por el marcador de células madre (DBA-)	74
Figura 13. Vistas de las distintas fases formadas en la purificación de las SSC mediante las columnas de Percoll. A y B. Vistas de la fase superior de la columna, con pocas células redondas y debris. C y D. Vistas del anillo formado entre las fases de densidad 20% y 30% donde se observan las SSC. E y F Vistas de la fase inferior de la columna, con gran cantidad de espermatozoides y glóbulos rojos.....	77
Figura 14. Viabilidades celulares con Azul de Tripán. A la izquierda se observa la viabilidad inicial (luego de las digestiones enzimáticas) y a la derecha, la viabilidad post percoll. La tinción diferencial permite distinguir las células vivas (transparentes, flechas amarillas) de las células muertas (azules, flechas azules); además en el pool de células testiculares también se observaron glóbulos rojos (recuadro rojo) y espermatozoides (elipses celestes).....	80
Figura 15. Comparación poblacional entre el grupo control (parte superior) y post percoll	

(parte inferior) evaluadas por citometría de flujo. Al lado izquierdo se observa el ploteo del total de células testiculares, con la selección de las células redondas dentro del recuadro verde (incluidas las SSC). En la columna de la derecha se observa el histograma con el análisis de las células seleccionadas y la clasificación de éstas en tres poblaciones (sDBA+, wDBA+, DBA-), según su fluorescencia.....	83
Figura 16. Comparación de las poblaciones control (A y B) y post percoll (C y D) evaluadas por microscopía de fluorescencia. A la izquierda se observa el campo fluorescente con las células marcadas según su afinidad con DBA; y a la derecha, el campo claro con el total de células testiculares	85
Figura 17. Cultivos control y post percoll en medio DMEM. (A-C) Vistas a 25X de los cultivos controles de 1, 4 y 8 días respectivamente. Se observa presencia de gran cantidad de glóbulos rojos (flechas negras) y detritus. (D-F) Vistas a 25X de los cultivos post percoll de 1, 4 y 8 días respectivamente. Se observan cultivos más limpios, con evidente reducción de glóbulos rojos u otros contaminantes, con formación de colonias celulares (flechas azules)	90
Figura 18. Caracterización de cultivos de células de Sertoli (CS) en medio DMEM + 10%SBF. (A) Vista a 25X de CS de 2 días de cultivo. (B) Vista a 25X de 5 días de cultivo, donde se aprecian células individuales con finas extensiones. (C) Vista a 10X del cultivo de 8 días, con grandes extensiones y contacto entre sí. (D) Vista a 25X con contraste de fase de células de 8 días de cultivo, donde se observa un núcleo con apariencia granular y contorno irregular. (E-F) Monocapa de CS luego de 2 y 3 semanas de cultivo, respectivamente	91
Figura 19. Co-cultivos (SSC post percoll -Sertoli) en medio DMEM. (A-B) Vista a 10X y en contraste fase 25X del primer día de co-cultivo. SSC (flechas azules) y células de Sertoli (cabeza de flecha negra). (C-D) Vistas a 10X de colonias de SSC en el tercer día de co-cultivo (flechas negras). (E) Día 4 visto en contraste de fase 25X. (F) Colonia de SSC en el día 8 del co-cultivo, visto a 25X. (G) Día 10 del co-cultivo, visto a 10X. (H) Vista a 10X de una clona de SSC en el día 13 del co-cultivo.....	94
Figura 20. Comparación de los co-cultivos (SSC post percoll-Sertoli) con sus controles (SSC post percoll sin Sertoli) en 16 días de cultivo. Co: co-cultivos; C: cultivo control	95
Figura 21. Histogramas del Par 1 (control y co-cultivo). Se comparan los porcentajes de las poblaciones sDBA+, wDBA+, DBA- de cada grupo.....	97

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros espermáticos de las 20 muestras testiculares evaluadas	75
Tabla 2. Valores de concentración y viabilidad inicial de las SSC (Grupo Control)	76
Tabla 3. Valores de concentración y viabilidad post percoll de las SSC (Grupo Post Percoll)	78
Tabla 4. Enriquecimiento de las SSC mediante las gradientes de Percoll	78
Tabla 5. Media del porcentaje de enriquecimiento de las células madre espermatozonales	79
Tabla 6. Comparación de las medias de las viabilidades de las SSC iniciales y post percoll	79
Tabla 7. Evaluación por Citometría de Flujo de la media porcentual de las poblaciones sDBA+, wDBA+ y DBA- (Grupo Control)	82
Tabla 8. Evaluación por Citometría de Flujo de la media porcentual de las poblaciones sDBA+, wDBA+ y DBA- (Grupo Post Percoll)	82
Tabla 9. Evaluación por Microscopía de Fluorescencia de la media porcentual de las poblaciones sDBA+, wDBA+ y DBA- (Grupo Control)	84
Tabla 10. Evaluación por Microscopía de Fluorescencia de la media porcentual de las poblaciones sDBA+, wDBA+ y DBA- (Grupo Post Percoll)	84
Tabla 11. Evaluación por Citometría de Flujo de la media porcentual de las poblaciones sDBA+, wDBA+ y DBA- (Grupo Cultivo Control 8d)	86
Tabla 12. Evaluación por Citometría de Flujo de la media porcentual de las poblaciones sDBA+, wDBA+ y DBA- (Grupo Cultivo Post Percoll 8d)	86
Tabla 13. Evaluación por Microscopía de Fluorescencia de la media porcentual de las poblaciones sDBA+, wDBA+ y DBA- (Grupo Cultivo Control 8d)	88
Tabla 14. Evaluación por Microscopía de Fluorescencia de la media porcentual de las poblaciones sDBA+, wDBA+ y DBA- (Grupo Cultivo Post Percoll 8d)	88
Tabla 15. Detalles de los 8 co-cultivos	93
Tabla 16. Porcentajes de células sDBA+, wDBA+, DBA- en 8 co-cultivos y sus respectivos cultivos control – Microscopía de Fluorescencia	96
Tabla 17. Porcentajes de células sDBA+, wDBA+, DBA- en 1 co-cultivo y su respectivo cultivo control – Citometría de Flujo	97

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Comparación por tratamiento (Control y Post Percoll) de las medias porcentuales de las poblaciones sDBA+, wDBA+ y DBA- evaluadas por Citometría de Flujo	82
Gráfico 2. Comparación por tratamiento (Control y Post Percoll) de las medias porcentuales de las poblaciones sDBA+, wDBA+ y DBA- evaluadas por Microscopía de Fluorescencia.....	85
Gráfico 3. Comparación por tratamiento (Cultivo Control 8d y Cultivo Post Percoll 8d) de las medias porcentuales de las poblaciones sDBA+, wDBA+ y DBA- evaluadas por Citometría de Flujo	87
Gráfico 4. Comparación por tratamiento (Control - Percoll - Cultivo Control 8d - Cultivo Post Percoll 8d) del porcentaje de células sDBA+ de las 8 muestras evaluadas por Citometría de Flujo	87
Gráfico 5. Comparación por tratamiento (Cultivo Control 8d y Cultivo Post Percoll 8d) de las medias porcentuales de las poblaciones sDBA+, wDBA+ y DBA- evaluadas por Microscopía de Fluorescencia	89
Gráfico 6. Comparación por tratamiento (Control - Percoll - Cultivo Control 8d - Cultivo Post Percoll 8d) del porcentaje de células sDBA+ de las 12 muestras evaluadas por Microscopía de Fluorescencia	89
Gráfico 7. Comparación porcentual de las células sDBA+ de los co-cultivos y sus controles- evaluación por Microscopía de Fluorescencia.....	96

ABREVIATURAS

SSC	: Células madre espermatogoniales
As	: Espermatogonia tipo A única o Asingle
Ap	: Espermatogonia tipo A en pares o Apaired
Al	: Espermatogonia tipo A en cadena o Aaligned
DBA	: <i>Dolichos biflorus agglutinin</i>
DBA-FITC	: DBA conjugado con isotiocianato de fluoresceína.
sDBA+	: strong DBA+ o fuertemente marcadas
wDBA+	: weak DBA+ o débilmente marcadas
DBA-	: sin afinidad al DBA
α GalNAc	: residuos α -N-acetilgalactosamina
GDNF	: Factor neurotrófico derivado de la línea celular glial
SCF	: Factor de célula madre
GM-CSF	: Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos
EGF	: Factor de crecimiento epidermal
FGF	: Factor de crecimiento fibroblástico
LIF	: Factor inhibidor de leucemia
CSF1	: Factor estimulante de colonias 1
IGF	: Factor de crecimiento insulínico
TGF- α	: Factor de crecimiento transformante α
TGF- β	: Factor de crecimiento transformante β

BMP4	: Proteína morfogenética ósea 4
FSH	: Hormona folículo estimulante
LH	: Hormona luteinizante
GnRH	: Hormona gonadotropina
AMH	: Hormona antimulleriana
PVP	: Polivinilpirrolidona
ABP	: Proteína ligadora de andrógenos
DSA	: <i>Datura stramonium agglutinin</i>
MEM	: Minimum Essential Medium Eagle
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
SBF	: Suero bovino fetal
BSA	: Suero de albúmina bovina
PBS	: Buffer fosfato salino
FACS	: Clasificación celular activada por fluorescencia
MACS	: Clasificación celular activada magnéticamente
RT-PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
SD	: Desviación estándar
GC	: Grupo Control
GPP	: Grupo Post Percoll
GCC	: Grupo Cultivo Control
GPP	: Grupo Cultivo Post Percoll

RESUMEN

El presente trabajo tiene por objetivo establecer un protocolo de enriquecimiento de las células madre espermato goniales (SSC) mediante gradientes discontinuas de Percoll y desarrollar co-cultivos con células de Sertoli que permita el cultivo continuo de las SSC, sentando las bases para futuros trabajos que busquen contribuir con la conservación del material genético de especies con problemas de fertilidad. Veinte muestras testiculares de alpacas adultas provenientes del Camal Municipal de Huancavelica fueron seleccionadas según sus parámetros espermáticos. Las biopsias testiculares fueron sometidas a dos digestiones enzimáticas, cuya suspensión resultante fue denominada Grupo Control (GC), y la purificación de éstas mediante las gradientes discontinuas, Grupo Post Percoll (GPP). Las muestras fueron evaluadas mediante Citometría de Flujo (CF) y Microscopía de Fluorescencia (MF) empleando el conjugado DBA-FITC con el que se identificó a las SSC como el grupo celular con mayor intensidad de fluorescencia (sDBA+). La evaluación por CF de 8 muestras y el análisis por MF de las 12 muestras restantes mostraron una mayor media porcentual de la población de SSC en el GPP en comparación a la del GC, afirmando el enriquecimiento de las SSC mediante las gradientes de Percoll ($p < 0.05$). Además, la comparación de la viabilidad celular entre ambos grupos (GC: $92.59 \pm 6.92\%$ y GPP: $92.47 \pm 5.79\%$) no mostró diferencia significativa ($p > 0.05$).

Estas poblaciones celulares iniciales (GC y GPP) fueron cultivadas durante 8 días en medio DMEM, denominándose Grupo Cultivo Control (GCC) y Grupo Cultivo Post Percoll (GCP) y fueron evaluados por CF y MF, encontrándose un aumento de la población de SSC en los post-cultivos. El análisis por CF no mostró diferencia significativa entre los grupos iniciales y sus respectivos cultivos (GC: $37.02 \pm 29.21\%$ vs GCC: $44.80 \pm 19.63\%$ y GP: $62.46 \pm 33.15\%$ vs GCP: $53.16 \pm 14.49\%$); por el

contrario, la evaluación por MF sí mostró un incremento significativo de la población sDBA+ en los cultivos (GC: $13.33 \pm 18.88\%$ vs GCC: $50.36 \pm 8.07\%$ y GP: $30.85 \pm 21.98\%$ vs GCP: $60.46 \pm 7.31\%$).

Paralelamente, se aislaron las células de Sertoli del grupo de células testiculares empleando la lectina DSA y se cultivaron en medio DMEM + 10%SBF. Una vez alcanzado el 90% de confluencia, éstas se co-cultivaron con las SSC enriquecidas en medio DMEM. En los primeros tres días se observó un rápido crecimiento de las SSC en contacto con las células de Sertoli y la formación de quistes sincitiales de SSC luego de aproximadamente dos semanas, lo que no se observó en los cultivos de células madre espermatogoniales enriquecidas sin células de Sertoli.

Del presente estudio se concluye que el empleo de las gradientes de Percoll es un buen método de enriquecimiento de SSC y el co-cultivo con células de Sertoli es capaz de promover la proliferación de las SSC en cultivos de corto plazo.

PALABRAS CLAVE

Células madre espermatogoniales, células de Sertoli, Percoll, DBA, DSA

SUMMARY

This work aims to establish a protocol for enrichment of spermatogonial stem cells (SSCs) by discontinuous Percoll gradients and develop co-cultures with Sertoli cells that allow the continuous culture of SSCs, laying the groundwork for future works that seeks to contribute to the conservation of genetic material of species with fertility problems. Twenty testicular samples of adult alpacas from the Municipal Slaughterhouse of Huancavelica were selected according to their sperm parameters. Testicular biopsies were subjected to two enzymatic digestions, whose cell suspension obtained was called Control Group (GC), and the purification of these by discontinuous gradients, Post Percoll Group (GPP). The samples were evaluated by Flow Cytometry (CF) and Fluorescence Microscopy (MF) using the DBA-FITC conjugate with which SSCs were identified as the cell group with the highest fluorescence intensity (sDBA+). The CF assessment of 8 samples and the MF analysis of the remaining 12 samples showed a higher percentage average of the SSC population in the GPP compared to GC average, corroborating the enrichment of SSCs using Percoll gradients ($p < 0.05$). In addition to this, the comparison of cell viability between the two groups (GC: $92.59 \pm 6.92\%$ and GPP: $92.47 \pm 5.79\%$) showed no significant difference ($p > 0.05$).

These initial cellular populations (GC and GPP) were cultivated for 8 days in DMEM medium, called Control Culture Group (GCC) and Post Percoll Culture Group (GCP) and were evaluated by CF and MF, with an increase in the SSC population in post-cultures. The CF analysis showed no significant difference between the initial groups and their respective cultures (GC: $37.02 \pm 29.21\%$ vs. GCC: $44.80 \pm 19.63\%$ and GP: $62.46 \pm 33.15\%$ vs GCP: $53.16 \pm 14.49\%$); on the contrary, the MF assessment showed a significant increase of the sDBA+ population in cultures (GC: $13.33 \pm 18.88\%$ vs. GCC: $50.36 \pm 8.07\%$ and GP: $30.85 \pm 21.98\%$ vs GCP: $60.46 \pm 7.31\%$).

At the same time, Sertoli cells were isolated from the testicular cell group using DSA lectin and grown in DMEM + 10%SBF medium. Once 90% confluence was reached, they were co-cultivated with SSCs enriched in the DMEM medium. In the first three days, rapid growth of SSCs was observed in contact with Sertoli cells and the formation of SSC syncytial cysts after approximately two weeks, which was not observed in cultures of enriched spermatogonial stem cells without Sertoli cells.

This study concludes that use of Percoll gradients is a good method of SSC enrichment and co-culture with Sertoli cells is able to promote the proliferation of SSCs in short-term cultures.

KEYWORDS

Spermatogonial stem cells, Sertoli cells, Percoll, DBA, DSA

INTRODUCCIÓN

El país cuenta con la mayor población de alpacas de Sudamérica, representa un recurso que proporciona carne y fibra, por lo que su crianza contribuye a la economía de miles de ganaderos de la zona altoandina (Quispe et al., 2009). Dicha actividad es realizada principalmente en las regiones de Puno, Cusco, Arequipa, Huancavelica, Apurímac, Ayacucho y Pasco por más de 80 000 ganaderos, responsables de que el país sea considerado como el mayor productor de fibra de alpaca a nivel mundial (Cenagro, 2012). Sin embargo, la crianza de esta especie es muy poco tecnificada, lo que impide obtener mayores beneficios de cada individuo. Además, la industria textil exige una gama de colores de fibra, por lo que los alpaqueros optan por la selección artificial con el fin de obtener individuos de fibra blanca dado que éstas podrían teñirse a diversos colores, provocando así la pérdida de la variabilidad genética de esta especie. Sumado a ello, la alpaca presenta diversos problemas reproductivos como la baja producción y calidad espermática, altas tasas de mortalidad embrionaria y baja tasa de fecundidad, derivando en la pérdida de la calidad de la fibra (Huanca, 2016). Por estas razones, es importante desarrollar biotecnologías que permitan conservar el material genético de las alpacas como técnicas de cultivo *in vitro* de células madre espermatogoniales (SSC), con el cual se logre proliferar la baja población de dichas células caracterizadas por llevar a cabo el proceso de espermatogénesis y ser las únicas con la capacidad de autorrenovación y diferenciación (Bravo *et al.*, 2000).

La búsqueda de optimización de estas biotecnologías ayudaría no solo a la mejorar la situación del grupo de ganaderos, sino también a la implementación de programas de mejoramiento genético que sienta las bases para la obtención de ejemplares con características deseables, elegidas por la mejor calidad de fibra o colores naturales y de esta manera contribuir a que no se pierda la diversidad genética de las especies.

MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL

1. Camélidos sudamericanos: La alpaca (*Vicugna pacos*)

1.1. Aspectos generales

1.1.1. Origen y taxonomía

Existen cuatro especies de camélidos sudamericanos, siendo la alpaca y la llama las especies domésticas, y la vicuña y el guanaco sus formas silvestres. Pertenecen a la clase *Mammalia*, suborden de los *Rumiantes*, orden *Artiodactyla*, familia *Camelidae*, tribu Lamini y representan un recurso genético de gran importancia económica, cultural y científica para el Perú, así como para algunos otros países de la Región Andina, por lo que han sido objeto de interés a lo largo de los años.

El origen de los camélidos sudamericanos ha sido debatido por numerosos científicos, siendo Frisch en 1775 quien propuso que las cuatro especies sean clasificadas dentro del género *Lama*. Sin embargo, Miller en 1924 en un estudio que no incluía muestras de alpaca y basado en la morfología dentaria de los incisivos separó a la vicuña dentro del género *Vicugna*, dejando a la alpaca (*Lama pacos*), llama (*Lama glama*) y guanaco (*Lama guanicoe*) dentro del género *Lama*. Más tarde, en un estudio más completo fueron detectadas similitudes en la morfología de los incisivos de los restos de alpacas y vicuñas, sugiriendo a las alpacas como la forma doméstica de la vicuña, y la llama como una especie originada del guanaco (Wheeler, 1984, 1995). Dicha premisa fue corroborada gracias a herramientas citogenéticas donde se determinó el mismo patrón de bandas G del cromosoma 1 entre alpacas y vicuñas; y herramientas moleculares mediante análisis de la secuencia parcial del gen citocromo *b* (Stanley *et al.*, 1994) y de cuatro microsatélites (Kadwell *et al.*, 2001). Finalmente, esto derivó en el cambio de la clasificación de la alpaca, pasando a ser *Vicugna pacos*, inicialmente propuesto por Kadwell *et al.*, (2001) y aceptado por Gentry *et al.*, (2004).

1.1.2. Importancia

La alpaca es una especie de gran importancia económica para el país ya que representa una fuente de carne y fibra para muchas familias. Según el Ministerio de Agricultura y Riego (Minagri) a través del IV Censo Nacional Agropecuario (Cenagro) del 2012, Perú es el mayor productor de fibra de alpaca en el mundo al contar con más de 3.6 millones de ejemplares, seguido de Bolivia.

De acuerdo con información brindada por el IV Cenagro, las regiones que concentran la mayor población de alpacas son Puno (39.6%), Cusco (14.7%), Arequipa (12.7%), Huancavelica (8.3%), Apurímac (5.9%), Ayacucho (2.8%) y Pasco (1.8%) (información extraída de la página institucional del Minagri <https://www.gob.pe/institucion/minagri/noticias/49289-el-peru-es-la-primera-potencia-mundial-en-produccion-de-fibra-de-alpaca>). Estos datos demuestran la importancia de la producción de fibra de alpaca, siendo el principal sustento de más de 82 mil ganaderos y representando el 70% u 80% del ingreso familiar anual (FAO, 2008).

Además de la fibra, la carne de la alpaca también es de suma importancia para el poblador andino ya que tiene un alto valor nutritivo con bajo contenido de grasa, la piel ideal para la industria de cuero y la sangre con una clase única de moléculas de inmunoglobulinas aptas para la producción de productos terapéuticos. Por dichas razones, la alpaca ha sido declarada Recurso genético del Perú, mediante Ley de promoción de mejoramiento genético y conservación de las razas de camélidos sudamericanos domésticos (Ley N° 28350).

1.2. Aspectos reproductivos

Los camélidos sudamericanos presentan características reproductivas propias, muy distintas a la de otros rumiantes. Presentan actividad sexual estacional entre diciembre y marzo con ausencia de ciclos estrales y un estado de receptividad sexual continua, la ovulación es inducida por el estímulo coital durante el cual la glándula pituitaria libera la

hormona luteinizante a la sangre, desencadenando la ovulación entre 30 a 72 horas post coito (Sumar *et al.*, 1993). Además, el plasma seminal también cumple un rol en la ovulación a través del compuesto conocido como *factor inductor de la ovulación*; la gestación se desarrolla en más del 90% de los casos en el cuerno uterino izquierdo pese a que ambos ovarios son igualmente activos en el aporte de óvulos, con la posibilidad de una sola cría debido a la pequeña capacidad del tracto reproductor de la alpaca y con un periodo promedio de gestación de 11 meses, lo que resulta en el nacimiento de la cría en un estado avanzado de desarrollo y con mayor posibilidad de sobrevivencia en un medio inhóspito como el alto andino (Adams y Ratto 2013).

Al igual que la hembra, el macho también presenta diferentes desventajas reproductivas o anomalías congénitas dando como consecuencia casos de infertilidad. Entre algunos de los defectos más comunes en el sistema reproductor del macho está la hipoplasia testicular caracterizada por la reducción del tamaño de uno o ambos testículos con poco o nada de células germinales, aplasia testicular, criptorquidia, entre otras (Huanca, 1996).

1.3. Razas de alpaca

La crianza de las alpacas se desarrolla en la región andina, particularmente en la zona central y sur a altitudes que van desde los 3800 hasta 5000 metros sobre el nivel del mar. Existen dos razas de alpacas en nuestro país, la Huacaya que representa el 80% del total de la población, 12% de la raza Suri y 8% de razas híbridas, las cuales presentan una alta diversidad genética y representan un importante ingreso económico a los pequeños productores pecuarios además de contribuir con la seguridad alimentaria y nutricional de estos (La Manna *et al*, 2011). Especímenes de la raza Huacaya se caracterizan por presentar el cuerpo cubierto totalmente con un vellón muy denso y de fibra pesada que les da apariencia esponjosa; en cambio, la raza Suri presenta el vellón más sedoso, lacio, ligeramente más fino y mucho más largo que los ejemplares de la

raza Huacaya. En cuanto a la proporción de los colores, se sugiere que es producto de la selección artificial ya que anteriormente el color de la fibra mayoritaria era el negro; dándose este cambio debido a la alta demanda de la fibra blanca por ser materia prima para ser teñida con tintes artificiales (Morante *et al.*, 2009).

2. Células testiculares

2.1. Células de la línea germinal

Las células madre espermatogoniales (SSC, del inglés *Spermatogonial Stem Cell*) son diploides, se localizan en la membrana basal de los túbulos seminíferos (porción exocrina del testículo) y son las únicas células adultas pluripotentes del testículo con capacidad de autorrenovación y diferenciación a células germinales funcionales (Rafeeqi y Kaul, 2013).

Las SSC son parte de un subgrupo de células germinales llamadas espermatogonias indiferenciadas, las cuales consisten en las de tipo A única (*Asingle* o *As*), pares de espermatogonias (*Apaiored* o *Ap*), y cadenas de 4, 8 y 16 células (*Aaligned* o *Aal*). Existe un modelo que refiere a las SSC como las células espermatogoniales menos diferenciadas o *As*, son las más primitivas, las únicas que mantienen su pluripotencia y experimentan tanto la autorrenovación como la diferenciación, es decir, son aquellas que permanecen como células individuales en la membrana basal de los túbulos seminíferos (Huckins y Clermont, 1968). Luego, cuando éstas se dividen, sus células hijas migran lejos el uno del otro para formar dos nuevas células donde una de ellas renueva el suministro de las espermatogonias tipo A (patrón mitótico llamado división homónima), mientras que la otra se convierte en espermatogonia tipo B, cuyas células hijas migran hacia el lumen (compartimento adluminal) al cruzar la barrera hematotesticular, dejando el compartimento basal donde permanecen juntas conectados por un puente intercelular mediante una citocinesis incompleta (división heterónima), siendo éste el primer paso a la diferenciación (Kubota y Brinster, 2018).

Las espermatogonias del tipo B son las últimas células de la línea germinal en dividirse mitóticamente y son aquellas responsables de generar a los espermatocitos primarios, fácilmente reconocibles por su gran cantidad de citoplasma y núcleo con cromatina condensada en forma de hebras delgadas (Huckins y Clermont, 1968). Una vez finalizada esta fase proliferativa se da inicio a la fase meiótica a partir de las divisiones de los espermatocitos primarios que originan dos espermatocitos secundarios haploides; y es durante la profase larga de la meiosis I que se realiza una replicación completa del ADN para formar las tétradas, seguido de un cruce de cromosomas homólogos que garantizan la heterogeneidad genética de las células germinales resultantes. Posteriormente, los espermatocitos secundarios concluyen la segunda división meiótica al formar las espermátides, aún conectadas la una a la otra mediante puentes citoplasmáticos. Finalmente, se da la última fase denominada espermiogénesis, un proceso de diferenciación morfológica donde ocurre la maduración de las espermátides a espermatozoides, y en el cual intervienen activamente las células de Sertoli, un tipo celular importante del microambiente espermatogénico (Figura 1).

Durante las divisiones de las espermatogonias tipo A1 a espermátides, las células se movilizan desde la membrana basal de los túbulos seminíferos hasta el lumen. Es por ello que cada tipo celular es encontrado en una capa particular del túbulo.

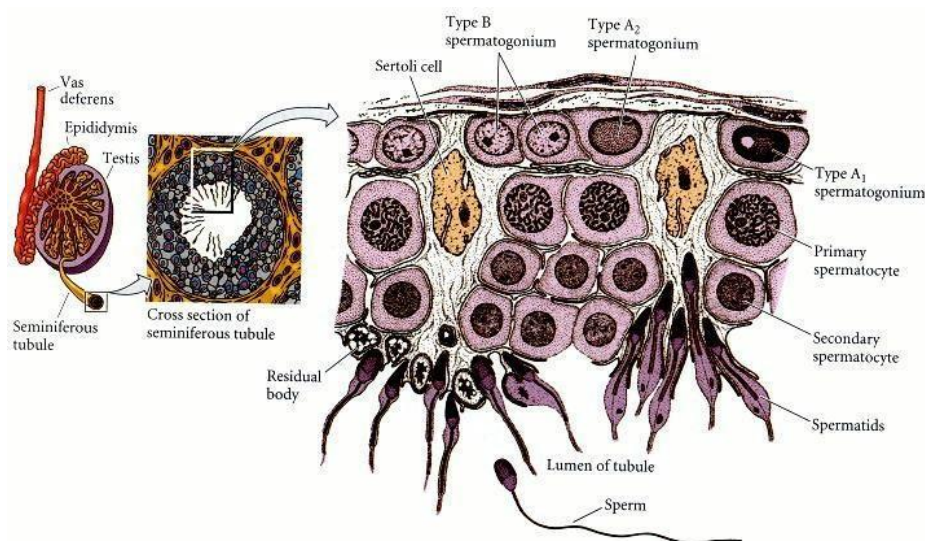


Figura 1. Células del epitelio seminífero (Fuente: Developmental Biology, 6th edition, Gilbert SF. 2000)

2.1.1. Células germinales en diferentes especies de animales

Las células madre de la línea germinal masculina provienen de las células germinales primordiales (PGCs), las cuales migran de la capa ectodérmica a las crestas urogenitales durante las primeras etapas del desarrollo embrionario (Clermont y Perey, 1957) y, tras la formación de los cordones seminíferos las PGCs pasan a ser llamadas gonocitos hasta los últimos periodos fetales o un poco después del nacimiento. Finalmente, la transformación de los gonocitos a SSCs se da durante la etapa pubertal; es decir, los gonocitos se mantienen en estado quiescente (arresto en la etapa G0/G1 del ciclo celular) hasta el inicio de la madurez sexual. En el caso de los ratones macho dicha transformación ocurre entre los días 0 y 6 post parto (Huckins y Clermont, 1968; de Rooij y Russell, 2000), momento en el cual los gonocitos reanudan gradualmente la mitosis y migran del centro a la periferia de los túbulos seminíferos, alcanzando la membrana basal para dar lugar a la formación de las espermatogonias (Culty, 2009); en cambio, la transición de gonocitos a SSCs en otras especies no está completamente definido, pudiendo darse luego de un largo periodo de tiempo, meses en caso de los ganados, aproximadamente 3 meses para las ovejas, 4 meses luego del nacimiento para el toro (Pedrana *et al.*, 2008; Borjigi *et al.*, 2010; Sarma y Devi, 2012), 2 meses en caso del cerdo y chivos, o años en los humanos u otros primates (Byskov y Hoyer, 1994).

Estudios sugieren la existencia de dos poblaciones diferentes de gonocitos en los testículos de ratón en la etapa neonatal, en donde una subpoblación toma directamente la vía de diferenciación, completando la primera ronda de espermatogénesis postnatal sin pasar por la autorrenovación, y otra subpoblación con la capacidad de autorrenovación que sería proveedora de un pool de espermatogonias As (A single) (Yoshida *et al.*, 2006). Es así como las SSC (o As) bajo un balanceado proceso de autorrenovación y diferenciación regulado tanto por estímulos ambientales extrínsecos como por la expresión genética intrínseca específica de cada especie, son capaces de producir millones o billones de espermatozoides al día durante la vida adulta del macho

(Phillips *et al.*, 2010). Por ejemplo, por día en el hombre adulto se generan 100 millones de espermatozoides y 1.6 billones de estas mismas células especializadas en el cerdo (Sharpe, 1994). Sin embargo, las SSC son un grupo celular muy reducido dentro de las células testiculares en las diversas especies. En roedores adultos, las poblaciones de espermatogonias indiferenciadas (As, Ap, Al) comprenden el 0.3% del total de células germinales en el testículo, del cual solo el 10% está representado por las As, es decir, las SSC comprende un estimado del 0.03% de las células germinales (aproximadamente 30 000 células por testículo), donde solo una porción de éstas es considerada “funcional” (Goel *et al.*, 2007; Valli *et al.*, 2015; p

Existen nueve diferentes poblaciones de espermatogonias en la rata y el ratón, con las subclases del tipo A (Asingle o As, Apaired o Apr, Aaligned o Aal, A1, A2, A3, y A4), intermedio (In) y tipo B (Huckins, 1978), donde las SSC son consideradas As por ser del tipo más primitivo y no contener puentes intercelulares; estas a su vez se dividen a Apr, aquella espermatogonia destinada a la diferenciación. Las Apr bajo una serie de divisiones mitóticas se convierten en las espermatogonias Aal₍₄₎, Aal₍₈₎ y Aal₍₁₆₎, para luego diferenciarse a la espermatogonia A1 (sin división mitótica), seguido de cinco divisiones sincrónicas que darían lugar a las formas A2, A3, A4, intermedio (In) y espermatogonia B, la que a su vez entra a meiosis para convertirse en espermatocito primario, secundario, seguir con la producción de espermátides haploides y finalmente obtener espermatozoides (Griswold, 2016). En estos roedores se ha determinado que las espermatogonias indiferenciadas (As, Ap, Aal) tienen una morfología muy similar, sin embargo, es la transición de la espermatogonia Aal a A1 la que determina el inicio de la diferenciación, acompañado de cambios significativos en la morfología celular y en el comportamiento mitótico (Griswold, 2016).

Si bien el proceso descrito es conocido en roedores como la rata y el ratón adulto, actualmente no se conoce con exactitud si el mismo proceso es conservado en otras especies de mamíferos machos. Sin embargo, se sabe que en la espermatogénesis de

los humanos y otros primates participan solo dos tipos de espermatogonias A, las Apale (Ap) que son las encargadas de autorrenovarse o de convertirse a las del tipo B y seguir con la diferenciación, y las Adark (Ad) que sirven como reserva de células madre y solo se dividen o transforman a tipo Apale en caso de una drástica reducción de espermatogonias como posterior a una irradiación o durante un tratamiento citotóxico; y es en los humanos que solo existe una generación de espermatogonia tipo B, lo que hace que la espermatogénesis sea menos eficiente que la de los roedores (Waheeb y Hofmann, 2011) (Figura 2). En cuanto a la relación de las células madre y la producción de espermatozoides diaria por gramo de tejido testicular en los ratones, el reducido grupo de espermatogonias indiferenciadas dada por el 0.3% de las células germinales (As, Ap y Aal) produce 40 millones de espermatozoides, una cantidad similar a la producida por las espermatogonias en los monos; en cambio la producción de espermatozoides en los humanos se reduce drásticamente (4.4 millones al día por gramo de tejido testicular) a pesar de ser producidas por una cantidad mucho mayor de células indiferenciadas (22%) (Fayomi y Orwig, 2018) (Figura 3).

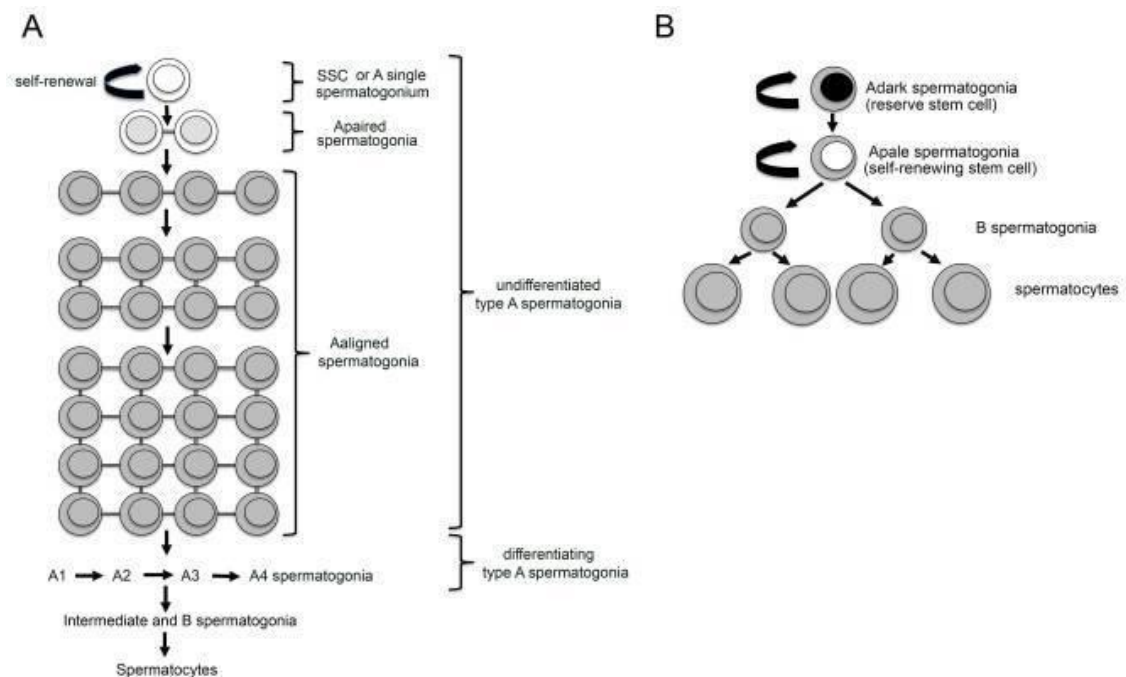


Figura 2. Representación esquemática de la espermatogénesis en roedores (A) y humanos (B) (Fuente: Waheeb y Hofmann, 2011)

Por otro lado, en caballos y asnos se ha establecido que la espermatogonia Aal se diferencia a A1 y, esta a su vez produce a la espermatogonia A2, luego pasa a A3 para finalmente dar lugar a las del tipo B1 y B2 (Johnson, 1991; Chiarini-Garcia, *et al.*, 2009). Además, morfológicamente las espermatogonias indiferenciadas (As, Ap, Aal) muestran un núcleo esférico y granular con poca heterocromatina; las espermatogonias A1, A2 y A3 presentan una ligera y finamente eucromatina granular, donde la heterocromatina se incrementa gradualmente de la espermatogonia A1 a la A3, mientras que las espermatogonias tipo B1 y B2 presentan un núcleo ovoide, una incrementada heterocromatina granular y nucleoplasma de aspecto granular (Costa *et al.*, 2012) (Figura 4). En bovinos la clasificación de las espermatogonias tipo A es muy diferente, dividiéndose en BSC (células madre basales) de morfología redonda y con tres nucléolos irregulares similar a las espermatogonias As y Ap del ratón, ASPC (células madre espermatogoniales agregadas) de diferentes tamaños y CSPC (célula precursora espermatogonial comprometida), que representan a las células más grandes y con un nucléolo central grande, comparados a las espermatogonias A1-A4 del ratón (Aguilar *et al.*, 2004).

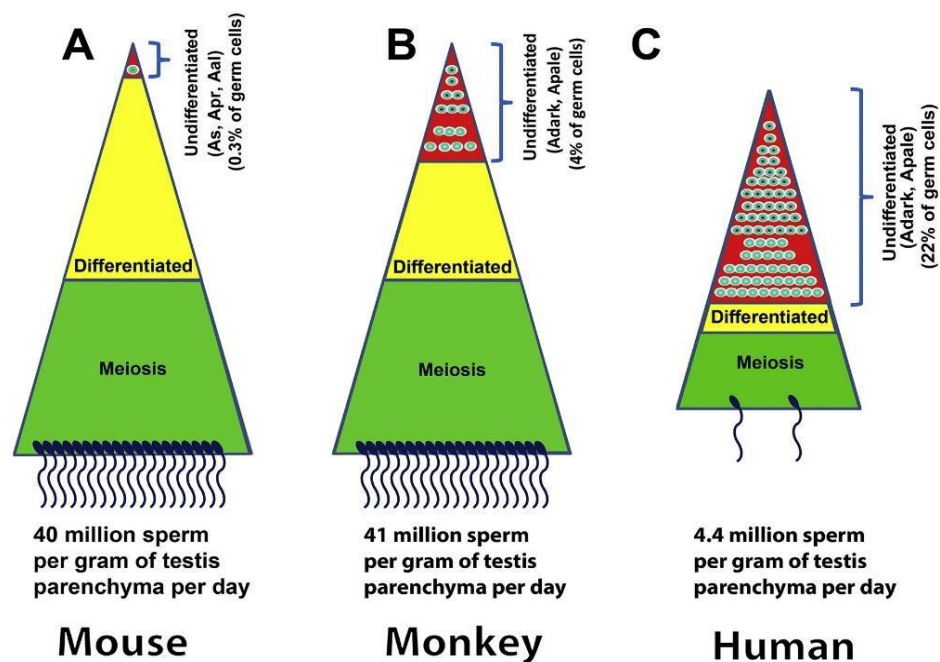


Figura 3. Comparación de los grupos de células madre y producción de espermatozoides en el ratón, monos y el hombre (Fuente: Fayomi y Orwig, 2018)

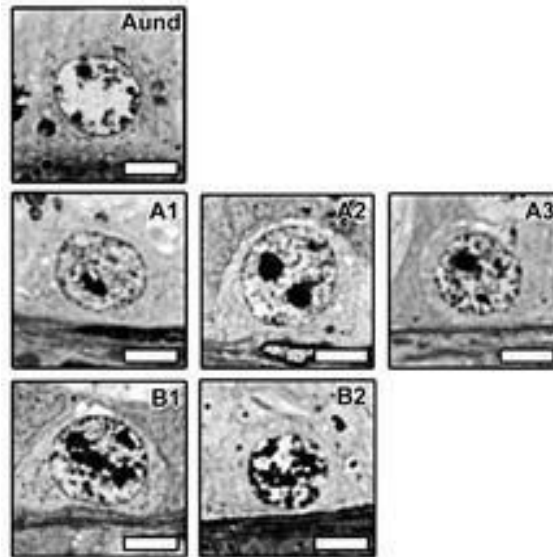


Figura 4. Morfología de las células espermatogoniales indiferenciadas (Aund) y diferenciadas (tipo A1, A2, A3, B1 y B2) del padrillo (caballo semental destinado a la reproducción) (Fuente: Costa *et al.*, 2012)

2.1.2. Nicho de las SSC

El nicho es el microambiente especializado dentro del testículo que provee estímulos externos que regulan el balance entre la autorrenovación, diferenciación, quiescencia y apoptosis de las SSC, comprendido por células circundantes a éstas (Spradling *et al.*, 2001). En mamíferos, las células de Sertoli son el principal contribuidor del nicho ya que representa un soporte estructural para las SSC y secreta diversos factores de crecimiento que median el progreso de la espermatogénesis. Sin embargo, también son importantes otras células somáticas que incluyen a las células mioides peritubulares, las cuales son de morfología aplanada y rodean la pared de los túbulos; y las células de Leydig, ubicadas al igual que las células mioides en el tejido intersticial, es decir, en el espacio que hay entre los túbulos seminíferos (Scadden, 2006). Otro factor probable sería la red vascular ya que se ha postulado la producción de nichos preferentemente adyacente a los vasos sanguíneos y el intersticio, particularmente asociados a los puntos de ramificación de los vasos sanguíneos (Yoshida *et al.*, 2007), como el observado en reportes con verracos (cerdos macho destinados a la reproducción) (Campos-Junior *et al.*, 2012). Sin embargo, este enunciado aún sigue en estudio (Figura

5). Adicionalmente, se ha determinado la naturaleza dinámica del nicho ya que los requerimientos para la autorrenovación de las SSC varían dependiendo de las etapas de la vida en los animales; donde los requisitos para la renovación intensiva durante el desarrollo neonatal contrastan a las condiciones para un estado más estable y ralentizado en la etapa adulta (Lord y Oatley, 2017). Es por ello que, con el fin de investigar la función biológica del nicho de las SSC se han realizado estudios de trasplante de SSC en ratones macho, obteniendo que al trasplantar SSC de ratones adultos a testículos de receptores infértiles jóvenes y adultos, el número y tamaño de las colonias formadas en los ratones más pequeños era diez y cuatro veces mayor, respectivamente. Si por el contrario se trasplantaban las células madre de los ratones más jóvenes a los adultos, se observaba que el número de colonias de SSC disminuía conforme mayor era la edad de los ratones receptores, sin diferencia significativa en el tamaño de las colonias formadas. Estos resultados corroboran el dinamismo del nicho, demostrando que en los animales más jóvenes éste es más accesible, soportan mejor la técnica del trasplante e indica que la edad es un factor determinante para el mantenimiento de la función de las células madre espermátogoniales, además de estar relacionado a la reducción de la fertilidad a medida que avanza el tiempo (Ryu *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006).

En la conformación del nicho se considera a las células de Sertoli como el principal regulador debido a la interacción directa que presenta con las células germinales, lo cual es sustentado por diversos estudios, donde en uno de ellos se obtiene un aumento de tres veces el número de SSC luego de trasplantar una población de células de Sertoli en los testículos de ratón, demostrando la influencia de estas células somáticas en la formación del nicho de las SSC después de la trasplantación (Oatley *et al.*, 2011a). Otros estudios sugieren la importancia de la capacidad endocrina de las células que conforman el nicho, siendo la estimulación de la hormona gonadotropina (GnRH) la responsable de que la pituitaria anterior produzca y libere las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH), las que a su vez regulan la función de las células

de Sertoli y Leydig, respectivamente. Es así que, Kanatsu-Shinohara y colegas encontraron que la inhibición de la liberación de la GnRH afecta negativamente la proliferación espermatogonial en los neonatos, mientras que en los adultos el efecto es contrario, es decir, se demuestra la importancia del rol de las gonadotropinas en la función del nicho, el cual varía dependiendo del estado de desarrollo del macho (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2004b). Entonces, en respuesta a la acción de las gonadotropinas, las células de Sertoli de murinos y primates liberan factores de crecimiento como el factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) y el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF2), implicados en el mantenimiento de la población espermatogonial (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2004b; Mäkelä *et al.*, 2014), mientras que la activina A y la proteína morfogenética ósea 4 (BMP4) son encargadas de promover la diferenciación (Nagano *et al.*, 2003). Por su parte, las células de Leydig y algunas células mioides producen el factor estimulante de colonias 1 (CSF1), el cual actúa en sinergia con el GDNF estimulando la autorrenovación de las SSC (Oatley *et al.*, 2009). En otros estudios se observó una acumulación de espermatogonias Ap y Aal en regiones del túbulo seminífero adyacentes a grupos de células de Leydig, por lo que se sugiere la contribución de estas células en el nicho de las SSC, además de mantener la espermatogénesis y el desarrollo de las gónadas mediante la producción de la testosterona (Yoshida *et al.*, 2007). Entre otras citoquinas, se ha demostrado que el factor inhibidor de leucemia (LIF) producido por las células mioides peritubulares, trabajaría junto al GDNF para estimular la proliferación de las SSC (Wang *et al.*, 2014). Aún más, se sugiere que las células peritubulares también pueden producir GDNF, lo cual se analizó en ratones knockout para el gen *Gdnf*, obteniéndose una reducción de la fertilidad asociada a la edad en estos animales, probablemente a consecuencia de la reducción de la proliferación de espermatogonias indiferenciadas (Chen *et al.*, 2016a). También se ha demostrado diferencias en cuanto a la existencia de receptores de la FSH y LH en las especies puesto que, en peces teleósteos las células de Leydig expresan no solo el receptor para la hormona luteinizante como en los vertebrados, sino

que además expresan receptores para la hormona folículo estimulante (García-Lopez *et al.*, 2009; Chauvigné *et al.*, 2014), pudiendo ésta actuar sobre las células de Leydig, estimulando la producción de andrógenos y factores de crecimiento como el transcrito del ligando Wnt no canónico (WNT5A) (Safian *et al.*, 2018) y la insulina tipo 3 (INSL3) (Assis *et al.*, 2016) encargadas de la autorrenovación y diferenciación de las SSC, respectivamente.

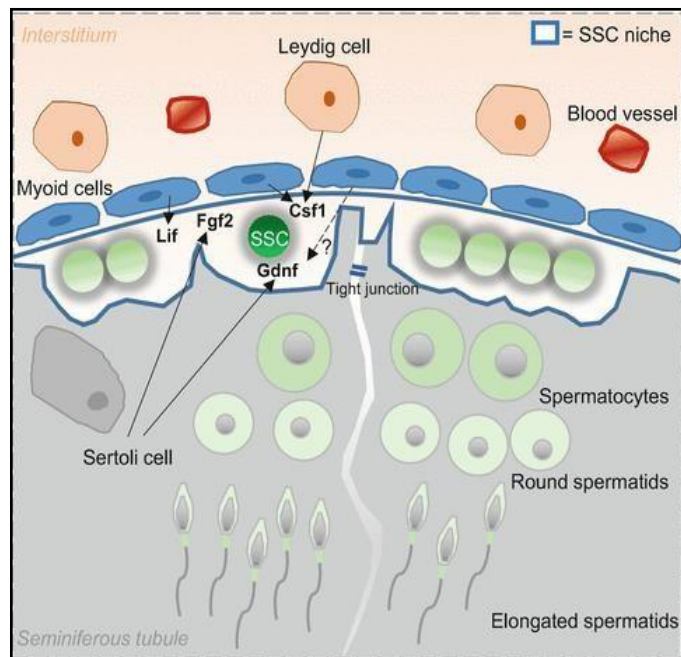


Figura 5. Nicho de las SSC (Fuente: Lord y Oatley, 2017)

2.1.3. Marcadores de superficie celular e intracelular de las SSC

Para conservar el material genético de una especie animal, entender las causas de la infertilidad masculina o desarrollar nuevas biotecnologías reproductivas, es necesario identificar los mecanismos de espermatogénesis en mamíferos; por ello se han realizado estudios *in vitro* de cultivos primario de células madre espermatogoniales de diferentes especies buscando aislar cantidad y pureza de estas células. Se identificaron marcadores específicos de SSC que permiten su aislamiento y caracterización, ayudan a monitorear los cultivos *in vitro* y dan a conocer si dichas células siguen manteniendo sus características o están iniciando la diferenciación hacia los espermatozoides

funcionales (Lee *et al.*, 2013a). Sin embargo, a pesar de haberse identificado muchos marcadores de células germinales, no todos son específicos para SSCs; algunos también son expresados por espermatogonias indiferenciadas e incluso por subpoblaciones de células somáticas testiculares (Oatley y Brinster, 2008). En base al conocimiento sobre la función de las SSC, el cual muestra que es el único tipo celular capaz de restablecer la espermatogénesis luego de la trasplantación, se ha determinado que la técnica de trasplante es hasta el momento la más eficaz para distinguir las células madre espermatogoniales de las demás células de su progenie, validando los marcadores moleculares propuestos para los diferentes animales (Lord y Oatley, 2017).

Los marcadores pueden ser detectados por técnicas de inmunohistoquímica en cortes histológicos, en preparaciones de láminas montadas de los túbulos seminíferos, inmunocitoquímica, Western blot, qPCR, xenotrasplantes, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), o mediante clasificación celular activada magnéticamente (MACS). Recientemente, se han identificado por inmunohistoquímica a ID4, PAX7, BMI1 y EOMES como cuatro marcadores de expresión específica de espermatogonias As de ratón (Oatley *et al.*, 2011b; Aloisio *et al.* 2014; Braun *et al.* 2017), GFRa1, NANOS2 y UTF1 se han visto restringidas a espermatogonias As, Apr y Aal₄ (Suzuki *et al.*, 2009; van Bragt *et al.*, 2008); mientras que ZBTB16 (también conocido como el factor de transcripción PLZF), SALL4, LIN28, CDH1 y FOXO1 se expresan en todas las espermatogonias indiferenciadas (As, Apr y Aal) (Costoya *et al.*, 2004; Hobbs *et al.*, 2012; Tokuda *et al.*, 2007; Goertz *et al.*, 2011; Gassei y Orwig, 2013). Uno de los marcadores de superficie más empleados para el aislamiento y enriquecimiento de las espermatogonias indiferenciadas es el receptor de membrana GFRa1, el cual ha sido descrito en ratón (Hofmann *et al.*, 2005), verracos (Kuijk *et al.*, 2009; Campos-Junior *et al.*, 2012), gatos (Powell *et al.*, 2011), monos (Hermann *et al.*, 2009), humanos (Gassei *et al.*, 2010) y, en un estudio pionero del 2012 se investigó la distribución y proporción de estas células en equinos, encontrando que la mayoría de ellas estaban localizadas en áreas adyacentes a los vasos sanguíneos de los túbulos seminíferos, mientras que

el análisis cualitativo y cuantitativo por Western blot mostró una prevalencia del 90% de células marcadas (GFRa1+) en el testículo de los sementales, sugiriendo que todos los subtipos de las espermatogonias indiferenciadas (As, Ap y Aal) expresan dicho receptor, dejando abierta posteriores investigaciones que evalúen posibles cambios en la producción de GDNF (ligando de GFRa1) por las células de Sertoli a través de las etapas del epitelio seminífero que influya en estos resultados (Costa, 2012). Entre otros marcadores, la expresión de las moléculas de adhesión celular $\alpha 6$ e integrina $\beta 1$ también han sido detectadas en la población de espermatogonias indiferenciadas de ratón y ratas, y recientemente se ha registrado la expresión de integrina $\beta 1$ en las SSC de alpaca adulta (Valdivia *et al.*, 2019b), donde la proteína cumple un papel importante en la célula debido a su unión a la laminina presente en la membrana basal de los túbulos seminíferos luego de realizarse un trasplante (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2008). Además, cadherina 1 (Cdh1), CD9 y la molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM) son expresadas en espermatogonias indiferenciadas, siendo las dos últimas originalmente clasificadas como marcadores de superficie de células madre embrionarias, donde CD9 a pesar de también ser expresadas por células germinales diferenciadas y células somáticas, conduce a un enriquecimiento siete veces mayor de SSC en roedores (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2004a). Entre los antígenos de superficie de las SSC de ratón está THY1 (previamente conocido como CD90), el cual se encuentra anclado a la glicoproteína glicosilfosfatidilinositol y es el primer marcador de superficie de espermatogonias indiferenciadas empleado en roedores, humanos y primates no humanos (Kubota *et al.* 2003); tiene gran capacidad de enriquecimiento en comparación con otros marcadores llegando a ser de 30 veces (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2004a), además de expresarse en gonocitos y SSCs de ganado bovino (Reding *et al.*, 2010), cerdos (Zheng *et al.*, 2013a) y chivos (Wu *et al.*, 2013; Abbasi *et al.*, 2013), corroborando a THY1 como un marcador de superficie conservado entre especies. La hidrolasa L-1 de ubiquitina carboxilo terminal (UCHL1 o también conocido como PGP9.5) ha sido el primer marcador detallado en espermatogonias y células de Sertoli de ratón (Kon *et al.*,

1999), mientras que en testículos pre púberes de cerdos, carneros, toros, búfalos, chivos, monos y humanos (Rodríguez-Sosa *et al.*, 2006; Von Kopylow *et al.*, 2010; Heidari *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2013a) solamente es expresado por gonocitos y espermatogonias As y Ap, por lo que es considerado un marcador citoplasmático óptimo de células germinales masculinas pre meióticas (Kon *et al.* 1999) al igual que la proteína dedos de zinc de leucemia promielocítica (PLZF) expresada en el núcleo de las espermatogonias indiferenciadas y gonocitos de ratón (Buaas *et al.*, 2004; Costoya *et al.*, 2004), conejos (Hermann *et al.*, 2010), cerdo, oveja (Borjigin *et al.*, 2010), chivo (Song *et al.*, 2013), bovino, equinos (Costa *et al.*, 2012), primates (Hermann *et al.*, 2009) y recientemente identificada en alpacas mediante la técnica de qPCR (Valdivia *et al.*, 2019b). Este marcador intracelular es altamente conservado en mamíferos y es esencial para el mantenimiento y autorrenovación de las SSC, co expresándose con OCT4 (también conocido como POU5F1, marcador intracelular de células madre primitivas, relacionado a la pluripotencia) y actuando como represor de los genes de diferenciación *Kit* y *Crtc1*. A diferencia de la mayoría de los marcadores que se han encontrado expresados en células germinales de ratón, la lectina *Dolichos biflorus agglutinin* (DBA) no se expresa en este roedor y tampoco muestra consistencia en las especies domésticas ya que su expresión es variada según la especie y la etapa de desarrollo en que se encuentran. Es así que, se ha evaluado la reacción de las células germinales a la lectina mediante el reconocimiento de residuos α -N-acetilgalactosamina (α GalNAc) presentes en la superficie celular, encontrando un marcaje de las células germinales primitivas y gonocitos del verraco (Goel *et al.*, 2007), así como de las espermatogonias indiferenciadas (principalmente As) de equinos (Verini-Supplizi *et al.*, 2000; Ha *et al.*, 2003), células redondas DBA+ de testículos de alpaca adulta donde se discrimina las SSC o As (*strong* DBA o sDBA+) de las espermatogonias en vías de diferenciación (*weak* DBA o wDBA+) según intensidad de marcaje analizadas por citometría de flujo (Valdivia *et al.*, 2019a), y una fuerte expresión de DBA en gonocitos y espermatogonias tipo A presentes en testículos de búfalos y bovinos pre púberes (Goel *et al.*, 2010, 2011;

Fujihara *et al.*, 2011); sin embargo, aunque el marcador podría ser empleado para caracterizar gonocitos y espermatogonias de algunos animales grandes, este no sería el caso de la oveja debido a que la expresión del DBA no se puede diferenciar en las células germinales en ninguna de sus etapas de desarrollo (Borjigin *et al.*, 2010). Si bien la búsqueda de marcadores que enriquecen la población de SSC se han centrado principalmente en el ratón, se ha determinado que las expresiones de algunos marcadores están relativamente conservadas entre roedores, monos y humanos como THY1, PLZF, GFRa1, UTF1, SALL4, LIN28, ITGA6 (Eildermann *et al.*, 2012; Aeckerle *et al.*, 2012); otros como el SSEA4 solo entre humanos y monos; e ID4, un marcador intracelular exclusivo de SSC, es conservado entre roedores y humanos (Zheng *et al.*, 2014). Otro marcador conservado es el c-kit (receptor del factor de células madre, *SCF*) expresado en espermatogonias diferenciadas que indica la transición a la espermatogonia A1 en roedores, a B1 en primates no humanos y a la espermatogonia B en humanos (Valli *et al.*, 2014).

Así como estos marcadores de células de la línea germinal, existen muchos más cuya expresión varía de acuerdo con las especies y a la edad de éstas. Como tal, se requiere más investigación para poder establecer nuevos marcadores biológicos específicos para las SSC, que faciliten su caracterización y aislamiento.

2.1.4. Métodos de identificación de SSC

Existe gran dificultad en la eficiencia de la identificación de las SSC debido a la información limitada de sus marcadores biológicos, sin embargo, se han desarrollado métodos con la capacidad de validarlos, siendo algunos de ellos la tinción inmunohistoquímica, citometría de flujo, microscopía de fluorescencia, empleo de RT-PCR, trasplantación celular, entre otras.

- Citometría de flujo

Esta técnica permite el análisis simultáneo y rápido de miles de células por segundo, permitiendo determinar el fenotipo y función de cada una de ellas para clasificarlas en diferentes poblaciones. El principio que sigue esta tecnología es similar a la tinción por inmunohistoquímica donde el anticuerpo a emplearse es marcado con un fluorocromo, el cual es incubado con el componente celular, en este caso las células testiculares. Durante el análisis, las células suspendidas en un medio líquido pasan en fila a través de un rayo de luz láser, donde las señales de fluorescencia de las células espermatozonales son transformadas a señales eléctricas y son analizadas la dispersión de luz e intensidad de fluorescencia. Existen diversos anticuerpos específicos hacia los marcadores de las SSC que son conjugados con un colorante como el isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina, aloficocianina, etc (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2005) que al interaccionar con la luz láser y emitir una determinada intensidad de fluorescencia hace posible la caracterización y cantidad de las poblaciones celulares, las cuales se ven representadas en las gráficas resultantes. Esta técnica es muy usada en diversos campos científicos, representando una opción viable para la identificación de las SSC (He *et al.*, 2015).

- Microscopía de fluorescencia

La herramienta empleada es un microscopio óptico convencional al que se le adapta un accesorio de iluminación llamado fluorescencia logrando observar imágenes por óptica convencional o también denominado campo claro, además de una observación por contraste con fluorescencia. Esta técnica específica y altamente sensible hace uso de fluorocromos, los cuales pueden acoplarse químicamente a anticuerpos que reconocen moléculas específicas en las células, pudiéndose estudiar también diversos procesos celulares, visualizar partes de una célula o diferenciar partículas muy pequeñas. Mediante la excitación de los fluoróforos (parte del fluorocromo que emite fluorescencia) con una luz de una determinada longitud de onda se genera el movimiento de un electrón a un estado de mayor energía, liberándose luz de una longitud de onda mayor, menor energía y color diferente a la luz absorbida. La luz de excitación atraviesa el filtro de mismo nombre, el cual selecciona las longitudes de onda capaces de excitar un fluoróforo particular dentro de la muestra, y la luz emitida es filtrada para llegar al detector y lograr la digitalización de la imagen. De esta manera se logra determinar la distribución de una molécula en particular, así como su cantidad y localización dentro de una célula (Lichtman y Conchello, 2005).

- RT-PCR

Se extrae el RNA de las SSC seguido de la retrotranscripción a cDNA, el cual es amplificado por PCR acompañado de primers para marcadores específicos de células madre. En un trabajo reciente, los resultados de la amplificación de la PCR confirman la presencia de las SSC de alpaca adulta debido a la expresión de genes como *Plzf* o integrina $\beta 1$ que promueven su mantenimiento y autorrenovación, mientras que el transcrito de la proteína ribosomal *Rplp0* puede emplearse como gen de referencia o *housekeeping* dado que su expresión es estable en tejidos gonadales de la alpaca macho (Valdivia *et al.*, 2019b). Es también a partir de los resultados de la amplificación

que se logra determinar la calidad y cantidad de las SSC, representando una técnica muy útil y fiable para su identificación; sin embargo, la principal desventaja es su alto costo.

- Trasplante de SSC

Esta técnica es considerada una herramienta de gran validez para la identificación funcional de las SSC *in vivo* ya que las células madre funcionales de un individuo donador podrían ser capaces de trasplantarse a la membrana basal de los túbulos seminíferos de los testículos de un receptor infértil y restablecer la espermatogénesis siempre que no existan barreras filogenéticas entre dichos individuos y tomando en cuenta que previo al trasplante es necesario el establecimiento de un sistema de cultivo *in vitro* de las células madre espermatogoniales con el que se logre proliferar y mantener la estabilidad celular por un largo período de tiempo (Brinster y Zimmermann, 1994).

Diversos trabajos demuestran que el trasplante de SSC de ratones y ratas a ratones infértiles puede reiniciar la espermatogénesis y finalmente generar espermatozoides funcionales en los hospederos (Brinster y Zimmermann, 1994; Jiang y Short, 1995; Ogawa *et al.*, 1999), abriendo las puertas a estudios sobre el potencial de las SSC de animales mayores para colonizar y proliferar en los testículos de receptores con problemas de fertilidad. Es así que, reportes de xenotrasplantes han dado a conocer que las SSC de especies domésticas son capaces de proliferar en testículos de ratones, pero sin lograr restablecer la espermatogénesis probablemente debido a la disparidad filogenética existente (Oatley *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2006), a excepción de especies cercanamente relacionadas como la rata y el ratón. Sin embargo, en casos de alotrasplante de SSC de bovinos, chivos, verracos, ovejas y perros sí ha sido posible obtener además de la colonización de las SSC, la producción de espermatozoides funcionales (Herrid *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008). En este procedimiento han sido

empleados ratones mutantes o tratados con inyección de busulfan (agente citotóxico que elimina las células germinales endógenas) como receptores a quienes se les trasplanta células germinales que llevan genes reporteros como la proteína verde fluorescente (GFP) a través del conducto eferente (Johnston *et al.*, 2000); de esta manera se examina si las células trasplantadas son capaces de restaurar la fertilidad, corroborando la naturaleza de las SSC como el único tipo celular con la capacidad de repoblar las colonias luego de la trasplantación.

De esta manera se tiene que la técnica de trasplante es empleada para la identificación de SSC, para la restauración de la fertilidad masculina, generación de animales transgénicos y la evaluación de posibles marcadores. Sin embargo, el uso de esta herramienta biológica es costosa y requiere más tiempo de trabajo, por lo que sigue en curso la búsqueda de otros métodos aún más eficaces.

2.1.5. Métodos de purificación y enriquecimiento de SSC

Dado que la cantidad de SSC en las diferentes especies es muy limitada, es necesario lograr su aislamiento y enriquecimiento con una alta viabilidad y pureza para posteriormente cultivarlas o manipularlas. Para ello, es importante el conocimiento del fenotipo de las SSC en el cual se basan las técnicas de enriquecimiento MACS y FACS; mientras que las técnicas físicas como el plaqueo diferencial, la selección con matrices extracelulares o el empleo de gradientes de centrifugación se basan en características biológicas como el tamaño, densidad o el tipo de crecimiento de las SSC. Además, trabajos con células testiculares de bovino han demostrado que la combinación de dos o más de estas técnicas de enriquecimiento es capaz de aumentar significativamente la pureza de las espermatogonias (Herrid *et al.*, 2009), lo que ha llevado a seguir estudiando las mejores combinaciones de los métodos para los diferentes casos.

- Clasificación celular activada magnéticamente (MACS, del inglés *Magnetic Activated Cell Sorting*)

Es un tipo de separación celular basado en el uso de esferas superparamagnéticas acoplados a anticuerpos específicos a marcadores biológicos de las células de interés. La población celular heterogénea pasa a través de una columna conformada por una matriz de esferas ferromagnéticas y a su vez, esta es colocada sobre un magneto que actúa atrayendo a las esferas con las células unidas a ellas. De esta manera, las células no marcadas fluyen libremente y las de interés quedan retenidas en la columna, las cuales son removidas y posteriormente lavadas para ser cultivadas. Esta técnica es actualmente empleada en procesos de reproducción asistida, donde las esferas son conjugadas a anexina-V permitiendo la separación de espermatozoides apoptóticos (anexina-V positivo) de los no apoptóticos que fluyen de la columna y conforman la fracción negativa a anexina-V (Makker *et al.*, 2008).

- Clasificación celular activada por fluorescencia (FACS, del inglés *Fluorescence Activated Cell Sorting*)

Es un tipo especializado de citometría de flujo empleado para clasificar una mezcla celular heterogénea como las células testiculares en diferentes contenedores, basándose en la deflexión electrostática de gotas cargadas y en el cual un mecanismo de vibración hace que el flujo de las células en suspensión se rompa en gotas logrando obtener células individuales, a las cuales se les asignan un tipo de carga según la fluorescencia presentada. Las gotas pasan a través de un sistema de deflexión electrostática conformada por dos placas cargadas que las desvían hacia la placa con polaridad opuesta, de modo que cada tipo de gota es recolectada en distintos tubos para posteriormente poder ser cultivadas (Naeem *et al.*, 2017).

- Plaqueo diferencial y matrices extracelulares

Este método se basa en las propiedades adhesivas de las células. A diferencia de las SSC, las células somáticas como las células de Sertoli, Leydig y células peritubulares se adhieren más rápidamente a las placas de cultivo, además de tener afinidad por la gelatina y lectinas, dejando a las SSC en el sobrenadante y haciendo factible la separación celular. En cambio, los receptores α y β integrina de las SSC se unen eficientemente a la laminina (proteína de la lámina basal de los tejidos epiteliales en los vertebrados), lo que resulta en una selección positiva de células madre (Binsila *et al.*, 2018), dejándolas adheridas en las placas. Además de la afinidad de las SSC por la laminina, se ha registrado que éstas se adhieren a las células alimentadoras como las células de Sertoli luego de que éstas últimas se adhieran a las placas de cultivo *in vitro*, demostrando que esta técnica es capaz de eliminar a las células somáticas; sin embargo, si el tiempo de adherencia no es juzgado correctamente y la recolección de las células germinales no se da en el momento preciso, es posible perder cantidades de SSC con alta actividad. Aunque esta técnica es bastante empleada por su inocuidad y eficacia en la obtención de una alta pureza de células germinales, el enriquecimiento puede tardar varias horas o días dependiendo de la especie trabajada, haciendo que las propiedades de las células puedan cambiar durante el periodo de cultivo *in vitro* (Shikina *et al.*, 2010).

- Gradientes de densidad

Este método permite separar células y partículas subcelulares en función de su densidad, para lo cual se emplean gradientes de densidad continuas o discontinuas y una centrifuga convencional. Los gradientes continuas se generan con un formador de gradiente o al centrifugar a velocidades elevadas, mientras que los gradientes discontinuos como el Percoll y el Ficoll se forman superponiendo capas de mayor a menor densidad, con la suspensión de células testiculares colocadas por encima de

todas las fases. Las diferentes poblaciones celulares sedimentan hasta alcanzar aquella posición en la que su densidad iguala a la del medio (sedimentación isopícnica), por lo que las SSC quedan retenidas en una determinada fracción la cual es retirada y lavada para poder cultivarse (Izadyar *et al.*, 2002). La gradiente de densidad está conformada por polímeros de elevado peso molecular como dextranos, Ficoll o Percoll, a su vez conformado por partículas de sílice coloidales y polivinilpirrolidona (PVP); y por un medio soluble en agua, inerte, que no sea viscoso a concentraciones elevadas ni ejerza mucha presión osmótica en disolución y sobre todo que no sea tóxico para las células. Sin embargo, el tiempo de centrifugación requerido para que las células sean separadas según su densidad puede afectar la viabilidad y actividad de las SSC (Izadyar *et al.*, 2002).

2.1.6. Mecanismos moleculares reguladores de la autorrenovación y mantenimiento de las SSC en mamíferos

El factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) secretado principalmente por las células de Sertoli y algunas células peritubulares es el primer factor de crecimiento que ha demostrado cumplir un papel esencial en la regulación de la autorrenovación de las SSC y el mantenimiento de la espermatogénesis. En ratones transgénicos, una sobreexpresión del gen *Gdnf* desarrolla una autorrenovación anormal de las células madre espermatogoniales con excesiva cantidad de éstas en los túbulos seminíferos; por el contrario, ratones knockout para el gen *Gdnf* muestran reservas agotadas de SSC y defectos en el proceso de autorrenovación, corroborando así la importancia de dicho factor (Meng *et al.*, 2000). Sin embargo, son muchas las moléculas que intervienen en los procesos de autorrenovación y diferenciación de las SSC, por lo que se han implementado y estudiado sistemas *in vitro* que permita obtener una población celular considerable para examinar directamente los efectos de la pérdida de función de una molécula específica sobre las funciones de las células madre espermatogoniales, lo que combinado con la técnica del trasplante proporciona información puntual. Dado que

GDNF ha sido identificado como un factor esencial en las funciones de las SSC, se han realizado estudios del perfil de expresión génica basado en microarrays para identificar genes regulados por la estimulación de GDNF presente en los cultivos celulares, demostrando la participación de numerosos factores de transcripción y la regulación negativa de genes involucrados en la diferenciación de espermatogonias (Naughton *et al.*, 2006).

Experimentos *in vitro* con SSC de ratón mostraron que la proliferación de éstas es dependiente de dos vías de señalización (Braydich-Stolle *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007). La unión del dímero de GDNF a su complejo receptor GFRA1/RET (receptor alfa 1 de GDNF/tirosin quinasa c-RET) induce la fosforilación de la familia de protein kinasas SRC (SFKs), seguido de la fosforilación de PI3K (fosfatidilinositol 3-kinasa) para finalmente activar la vía de señalización PI3K/Akt, la que influye en la sobrevivencia y proliferación de las SSC, inhibición de la apoptosis (Oatley *et al.*, 2007) y regulación de Foxo1, un factor de transcripción con influencia en c-RET (Goertz *et al.*, 2011). Adicionalmente, la vía GDNF/SFK permite la regulación de la expresión de genes que codifican factores de transcripción importantes para la autorrenovación de las SSC, tales como *Etv5*, *Bcl6b*, *Lhx1*, *Id4* (Oatley *et al.*, 2007) y *Pou3f1* (Wu *et al.*, 2011), cuyas funciones fueron demostradas usando RNAi y la técnica de trasplante de espermatogonias, donde resalta *Etv5* debido a que regula la expresión de genes como *c-Ret*, *Bcl6b*, *Brachyury*, o microRNA-21 (miR-21), siendo la función de este último el de prevenir la apoptosis de SSCs (Niu *et al.*, 2011).

Además del factor de crecimiento GDNF que regula diversos factores de transcripción en la población de espermatogonias indiferenciadas, FGF2 es otro factor importante en la autorrenovación de las SSC, siendo la responsable de activar la vía MEK (Mapk1/3) y regular la expresión de *Bcl6b*, *Etv5* y *Lhx1* (Ishii K *et al.*, 2012). Sin embargo, este factor también producido por las células de Sertoli por sí sola no es capaz de mantener la autorrenovación de las SSC *in vitro*, pero la adición de FGF2 en el medio de cultivo con GDNF presente sí puede promover el proceso de autorrenovación, sugiriendo que

FGF2 aumenta la sensibilidad a la señal de GDNF al mejorar la expresión de genes regulados por GDNF (Takashima *et al.*, 2015). Un efecto similar es observado al añadir el factor estimulante de colonias (CSF1) al medio de cultivo, registrando una mejora en el proceso de autorrenovación de las SSC siempre que GDNF está presente (Oatley *et al.*, 2009).

Existen otros factores de transcripción también involucrados en el mantenimiento del estado indiferenciado de las células madre espermato goniales que, a diferencia de los anteriormente mencionados, actúan independientemente de GDNF, tales como Plzf, TATA-box Binding Protein Associated Factor 4b (Taf4b) y la proteína de retinoblastoma (Rb1) (Oatley *et al.*, 2006). Entre ellos destaca Plzf, un represor transcripcional conocido por estar involucrado en la regulación de la progresión de la fase G1 a S del ciclo celular de las células madre hematopoyéticas (Vincent-Fabert *et al.*, 2016). En los testículos la expresión de Plzf no es específica de las SSCs sino que se da en toda la población de espermato gonias indiferenciadas, sin embargo, su expresión es indispensable para el mantenimiento de las SSC (Costoya *et al.*, 2004) y actúa como represor de genes implicados en la diferenciación como *c-kit*, Cyclin D1 (*Ccnd1*) y *mTorc1*. Además, el factor Plzf puede inducir la expresión de Redd1, un inhibidor de mTorc1 encargado de desregular la expresión de los componentes del receptor de GDNF (Hobbs *et al.*, 2010), por lo que la inactivación de este factor al igual que Taf4b y Rb1 resulta en la reducción de reserva de SSC (Lovasco *et al.*, 2015). A la fecha, aún no se han esclarecido los mecanismos por lo que otros componentes como el factor de crecimiento epidermal (EGF) influencia en la autorrenovación y sobrevivencia de las SSC; sin embargo, los estudios se centran especialmente en los procesos de los mamíferos.

2.1.7. Mecanismos moleculares reguladores de la diferenciación de las SSC en mamíferos

Los mecanismos de diferenciación de las SSC no han sido tan estudiados como los mecanismos de autorrenovación, por lo que se conoce poco acerca de los factores participantes. Sin embargo, se ha reportado al ácido retinoico (metabolito de la vitamina A) como un componente con la capacidad de diferenciar las espermatogonias indiferenciadas a las del tipo A1 *in vitro* (Schrans-Stassen *et al.*, 1999).

Estudios con cultivos de células testiculares de ratón demuestran que el ácido retinoico activa la transcripción de *Stra8* y *Sall4* y actúa favoreciendo la expresión de los genes de diferenciación como *kit*, *Sohlh1* y *Sohlh2*, mientras que inhibe la expresión del gen *Plzf* (Gely-Pernot *et al.*, 2015). Además, se ha reportado que el ácido retinoico regula la expresión de genes de histonas centrales dependiente de la replicación, donde durante el proceso de diferenciación espermatogonial el estado de cromatina nuclear cambia significativamente y se regula con precisión la expresión de diversas proteínas de unión al ADN y ARN (Chen *et al.*, 2016b).

2.2. Células de Sertoli

2.2.1. Fisiología

Son células somáticas que forman parte del conjunto de células testiculares, se encuentran apoyadas en la membrana basal de los túbulos seminíferos y su citoplasma se extiende hasta el lumen o luz del túbulo (donde se liberan los espermatozoides), siendo esta disposición la responsable de que las células de Sertoli sean capaces de interactuar de forma dinámica con las células mioides, con otras células presentes en el compartimiento intersticial, incluyendo las células de Leydig, así como con las diversas generaciones de las células de la línea germinal (Wheater, 1979). La porción apical de esta célula somática se asocia a espermatidas en procesos de maduración y espermatozoides, su superficie lateral envía procesos alrededor de espermatocitos y espermatidas tempranas; mientras que la base se encuentra en contacto con las

espermatogonias, proporcionando soporte estructural y metabólico para la proliferación y diferenciación de éstas; por lo que comúnmente son llamadas células nodrizas, células alimentadoras, células sustentaculares o células de sostén (Berensztein, 1998). Su citoplasma contiene abundante retículo endoplasmático liso y rugoso, mitocondrias, aparato de Golgi y lisosomas que participan en el proceso de digestión de cuerpos residuales liberados durante el proceso de maduración de las espermatídes a espermatozoides (espermiación), además de la digestión de las células germinales degeneradas (Steinberger *et al.*, 1977). Estas células de mamíferos ocupan un volumen aproximado de 2000 a 7000 μm^3 dentro del epitelio seminífero, con un núcleo de forma alargada u ovoide que varía entre 250 a 850 μm^3 ubicado en la parte basal de la célula, tienen una membrana nuclear invaginada, un nucleoplasma relativamente homogéneo y un nucléolo en tres partes, lo cual es evidenciado en el microscopio electrónico (Steinberger *et al.*, 1977).

Gracias a la observación de exclusión de colorantes, marcadores electrodenso y otras moléculas pequeñas de los túbulos seminíferos en animales adultos, se propuso la existencia de una barrera semipermeable entre la sangre periférica y los testículos (Fawcett, 1970). Más adelante, se demostró que dicha barrera hematotesticular estaba constituida por complejos de unión estrecha (tight junctions) de las células de Sertoli, célula-célula localizados en la porción basal del epitelio seminífero, marcando de esta manera la entrada progresiva a la pubertad (Plöen y Setchell, 1992), etapa en la cual las células de Sertoli dejan de dividirse y se inicia la actividad meiótica del espermatocito primario. De esta manera, el microambiente testicular es separado en dos compartimentos, el basal que contiene las células germinales premeióticas (espermatogonias y espermatocitos pre leptoténicos) y el adluminal conteniendo las células germinales meióticas y post meióticas (espermatocitos en estadios más avanzados de la meiosis, espermatídes y espermatozoides) (Dym y Fawcett, 1970) (Figura 6).

Tras la división meiótica es necesario un aislamiento celular adecuado ya que no solo existen las espermatogonias (presentes desde el nacimiento) en el testículo, sino que también se hacen presentes los espermatocitos y espermátidas durante la pubertad, haciéndose factible la generación de autoanticuerpos frente a las células germinales (Malkov *et al.*, 1998). Es así como la barrera hematotesticular cobra importancia al evitar que proteínas desconocidas de los espermatozoides lleguen al torrente sanguíneo y el sistema inmune cree anticuerpos contra estos, pudiendo ser una causa de esterilidad masculina. A su vez, esta barrera formada también por uniones GAP, impide la entrada de las células del sistema inmune como macrófagos, células dendríticas o células T a alguno de los dos compartimentos de los túbulos seminíferos, protegiendo de esta manera el normal proceso espermatogénico (Awoniyi *et al.*, 1989; Marathe *et al.*, 1995).

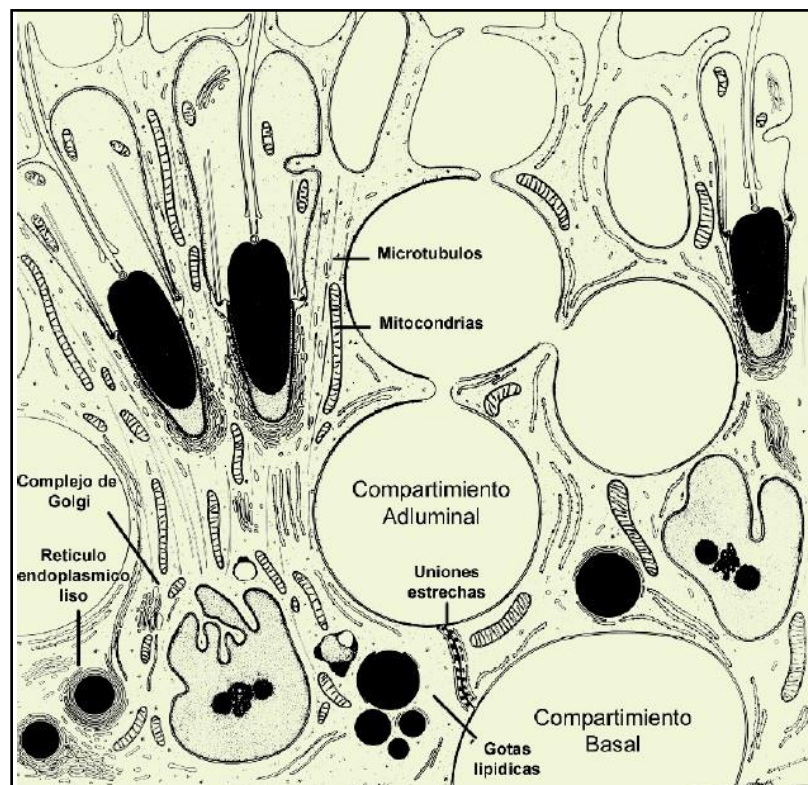


Figura 6. Ilustración de las uniones estrechas entre células de Sertoli que dividen el epitelio seminífero en un compartimiento basal y otro adluminal (Fuente: Fawcett DW en Handbook of Physiology, 1975).

2.2.2. Otras funciones

Algunas de las funciones de las células de Sertoli fueron ya mencionadas, como la promoción normal de la espermatogénesis con el soporte estructural del epitelio seminífero, protección y nutrición de las espermatogonias; formación de la barrera hematotesticular, desplazamiento de las células germinales con la liberación final de los espermatozoides hacia la luz del túbulo, fagocitosis de las células germinales en degeneración y del citoplasma excedente liberado por las espermátides durante el proceso de maduración (Bustos-Obregon, 1970; Kierszenbaum, 1994). Además de ello, la función secretora es de gran relevancia ya que son las encargadas de secretar una considerable cantidad de proteínas, las cuales constituyen la base molecular de las interacciones de las células de Sertoli (Griswold, 1995; Griswold, 1988). Estos productos proteicos son secretados en determinadas direcciones, donde las proteínas destinadas a interactuar con las células germinales adluminales o el epidídimo son secretadas apicalmente; mientras que aquellas encargadas de controlar a las células germinales tempranas, las células mioideas y a las células de Leydig son secretadas basalmente (Weiss, 1986).

Esta función abarca tanto la producción de fluidos del túbulo seminífero como la producción de más de 100 proteínas diferentes, siendo las más resaltantes la proteína ligadora de andrógenos o ABP (androgen binding protein), la transferrina, la hormona antimülleriana o AMH (anti-müllerian hormone), la inhibina, la gamma glutamil transpeptidasa, además de proteasas como la aromatasa, el activador de plasminógeno y también de componentes de la matriz extracelular y factores asociados a la proliferación celular (Jégou, 1992).

Se presenta algunas de las principales sustancias secretadas:

- Proteína ligadora de andrógenos (ABP)

Es una proteína que une esteroides androgénicos con una alta afinidad y es secretado al lumen de los túbulos seminíferos para finalmente ser transportado al epidídimo

(Means *et al.*, 1976). Inicialmente, fue encontrada en el citosol de éste (Ritzen, 1971); sin embargo, estudios posteriores demostraron que el testículo también contenía dicha proteína termoestable (Hansson *et al.*, 1974, 1975; Vernon *et al.*, 1974) y que su origen era testicular, específicamente que provenía de las células de Sertoli (Steinberger *et al.*, 1975; Fritz *et al.*, 1978; Tindall *et al.*, 1977, 1983). La proteína ABP ha sido encontrada en especies como el conejo, ratón, carnero, chivo, perro, mono, bovino y el hombre (Tindall *et al.*, 1980) y se ha detallado que se une a la testosterona, para luego transportarla en el fluido del túbulo al epidídimo. La testosterona una vez liberada del ABP, es convertida a DHT (dihidro testosterona, andrógeno más potente) por la enzima SRD5A1 y 2, siendo un paso importante ya que dicha hormona participa en la maduración de los espermatozoides en el epidídimo. De esta manera, a pesar de que aún faltan más investigaciones para determinar con precisión las funciones y modo de acción de esta proteína, se ha propuesto a la ABP como una molécula transportadora de andrógenos (Bernard y Barry, 2015).

- Transferrina

Es una proteína presente en todos los mamíferos, su secreción es estimulada por la hormona folículo estimulante (FSH) o AMPc y funciona como transportadora de hierro (Skinner y Griswold, 1980). Se propuso a las células de Sertoli como parte de un sistema de lanzadera de hierro, diseñado para transportar iones férricos alrededor de las uniones estrechas y finalmente suministrarlas a las células germinales del compartimento adluminal, donde el hierro es un elemento crucial para el crecimiento de espermatozoides secundarios y espermátides tempranas (Sylvester, 1993).

- Hormona Antimülleriana (AMH)

Es una glicoproteína dimérica, pertenece a la familia del factor de crecimiento transformante β (TGF β) y es producida por células de Sertoli inmaduras (fetal-prepuberal), siendo un marcador distintivo de la célula de individuos prepúberes. Es

responsable de la regresión del ducto Müller, la que desarrollaría el tracto reproductivo femenino y regula la producción de andrógenos por las células de Leydig (Grinspon *et al.*, 2010). En menor grado, esta hormona endocrina también es sintetizada por células de Sertoli maduras y células de la granulosa; es estimulada por la FSH e inhibida por andrógenos, cuya regulación examinada a nivel transcripcional demuestra que los factores de transcripción SF1, GATA-4 y Sox8 regulan el promotor AMH (Schepers *et al.*, 2003).

- Inhibina y activina

La inhibina es una glicoproteína dimérica soluble en agua, con función endocrina y encargada de inhibir selectivamente la síntesis y secreción de FSH, lo cual fue demostrado por diversos autores en estudios hechos en rata (Steinberger A. y Steinberger E., 1976; Chowdhury *et al.*, 1978; De Jong *et al.*, 1979). Existen dos formas bioactivas de esta proteína, la inhibina A ($\alpha\beta A$) y B ($\alpha\beta B$), siendo esta última la forma circulante en el hombre y la que se produce en los testículos, principalmente por las células de Sertoli (O'Connor y de Kretser, 2004). La expresión y secreción de la inhibina B cambia durante el transcurso de la vida, encontrando en el suero un pico alto de secreción poco después del nacimiento, probablemente reflejando la actividad proliferativa de las células de Sertoli; es decir, la producción de esta proteína refleja los patrones de maduración. Esta hormona podría ser usada como indicador del proceso espermatogénico y esterilidad masculina, donde el nivel proteico sería significativamente mayor entre los hombres fértiles que en los hombres estériles (Myers, *et al.*, 2009).

Similar a la inhibina, la activina pertenece a la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF β); sin embargo, ésta presenta dos formas constituidas por homodímeros de dos subunidades, siendo la más estudiada la activina A ($\beta A\beta A$) producida por las células de Sertoli y cuya secreción está regulada por la FSH participando a su vez, en la secreción de ésta. Además de las células de Sertoli, la

activina A también es producida por las células de Leydig y células peritubulares, encontrándose una mayor expresión en las etapas fetal y postnatal con una concentración máxima durante el periodo de proliferación de las células de Sertoli y una disminución paulatina de la hormona a medida que se alcanza la pubertad (Buzzard *et al.*, 2003a). Durante la etapa fetal, las células de Leydig son las principales células productoras de activina A en el ratón y el humano; mientras que cultivos *in vitro* de células mioides peritubulares neonatales muestran mayor producción de dicha hormona que las células de Sertoli, además de demostrarse el efecto sinérgico de la activina A con la FSH en la proliferación de las células nodrizas (Meehan *et al.*, 2000). En cuanto a la variación de producción de la activina A, ésta presenta un descenso más marcado en la pubertad avanzada, etapa en la cual las células de Sertoli maduran (formación de uniones estrechas, detención de la mitosis) para finalmente mantener el número celular durante la adultez (Barakat *et al.*, 2008).

En resumen, durante las etapas fetal y postnatal la activina A se encarga de estimular la proliferación de las células de Sertoli; mientras que el incremento de la inhibina B durante la pubertad contrarresta los efectos de la activina A.

- Lactato

Este metabolito de la glucosa es una fuente energética para espermátocitos y espermátides, y dado que estas son incapaces de realizar eficientemente el proceso de glucólisis, las células de Sertoli representan una fuente nutricional importante para las células germinales (Jutte *et al.*, 1981; Grootegoed *et al.*, 1984).

En estudios *in vitro* realizados con cultivos de células de Sertoli de ratas inmaduras se obtuvo que la FSH estimula la producción de lactato y piruvato a partir de glucosa (Grootegoed *et al.* 1981; Mita *et al.* 1982; Jutte *et al.* 1982, 1983), así como de citoquinas y factores de crecimiento como el factor de crecimiento insulínico o IGF-1, el factor de crecimiento epidérmico o EGF (Mallea, 1986), la insulina (Oonk *et al.*, 1985) y glucagón (Eikvar *et al.*, 1984).

- Factor de crecimiento GDNF

El factor de crecimiento derivado de células gliales (GDNF) es secretado por las células de Sertoli, y a su vez, influencia la proliferación de estas células pre púberes; sin embargo, su objetivo principal es estimular la proliferación y desarrollo de las espermatogonias en etapa temprana a través de la unión a su complejo receptor GFRA1/RET (receptor alfa 1 de GDNF/tirosin quinasa c-RET) (Hu *et al.*, 1999).

2.2.3. Regulación funcional

A) Regulación por andrógenos y la hormona folículo estimulante (FSH)

- Hormona folículo estimulante (FSH)

Gracias a cambios morfológicos en las células de Sertoli se supo que la FSH (hormona folículo estimulante) estimulaba su producción, ejerciendo su efecto principalmente durante la etapa fetal. Se observó que luego de la administración de esta hormona *in vivo* a ratas inmaduras hipofisectomizadas, se producía una hipertrofia de las células de Sertoli y a su vez, se incrementaba la secreción del fluido tubular (Murphy 1965a, 1965b). Más adelante, en animales jóvenes de 10 días, se demostró que la FSH aumentaba la síntesis de ARN y proteínas en el testículo, argumentando que debido a la edad tan temprana donde solo existen espermatogonias y células de Sertoli, el efecto de la hormona debía ser en uno o ambos tipos celulares (Means y Hall, 1967; Means 1970, 1971). En 1974, estudios hechos en animales cuyos gonocitos fueron destruidos en la vida fetal, se observó que la FSH producía la misma respuesta que en los testículos de animales inmaduros, demostrando así que las células de Sertoli eran el blanco de acción de la hormona folículo estimulante (Means y Huckins, 1974).

La FSH secretada por la adenohipófisis es la principal hormona endocrina conocida por regular algunas funciones de las células de Sertoli y, en combinación con otros factores cumple un papel importante en su adecuada proliferación durante la etapa fetal y

postnatal temprana, así como en la regulación de la diferenciación luego del cese de la mitosis en la pubertad (Means *et al.*, 1976; Orth, 1984). El proceso se inicia con la unión de la hormona a sitios receptores específicos en la membrana celular, activando la adenilato ciclasa e incrementando la concentración del AMPc intracelular, lo cual resulta en la estimulación de la proteincinasa A, AMPc-dependiente y desencadenando una cascada de eventos de fosforilación proteica (Fakunding y Means, 1977). Como resultado de dicha estimulación hormonal la actividad secretora de las células de Sertoli se ve incrementada, teniendo aumentos en la secreción de la proteína ligadora de andrógenos, la transferrina, inhibina, lactato, entre otras (Vihko *et al.*, 1989).

En 1976, Means y colaboradores demostraron que las células de Sertoli eran las únicas en el túbulo seminífero que poseían receptores para la FSH. Sin embargo, existen otras hormonas asociadas a estas células somáticas, como la testosterona; cuya acción también se ejerce en las células mioideas peritubulares (Fritz, 1978; Skinner y Fritz, 1985 a y b). Aunque la acción de la FSH en las células de Sertoli de animales prepúberes está demostrada por el incremento de nivel del AMPc y del estradiol (Fritz *et al.*, 1976), aún no se conoce bien el efecto sobre las células de animales adultos ya que podría variar de especie a especie. En algunos casos se postula que la actividad bioquímica llevada a cabo por la FSH en animales prepúberes es reemplazada por la testosterona en la vida adulta (Zirkin *et al.*, 1994).

- Testosterona

Así como la gonadotrofina hipofisiaria folículo estimulante (FSH) regula en forma directa las funciones de las células de Sertoli, la hormona luteinizante (LH) ejerce la regulación en forma indirecta a través de andrógenos secretados por las células de Leydig como la testosterona.

Diversos estudios han demostrado la existencia de receptores de andrógenos en el testículo, los cuales en su mayoría se encuentran asociados a las células de Sertoli (Tindall *et al.*, 1977) y donde el nivel de expresión de dichos receptores aumenta en

relación con la maduración celular. Respecto a la acción de los andrógenos en las células de Sertoli, se ha demostrado la estimulación de la proteína ABP y la inhibición de la actividad aromatasa; sin embargo, no se ha logrado demostrar con precisión acciones directas de los andrógenos sobre parámetros bioquímicos de las células de Sertoli. El principal andrógeno es la testosterona, cuya acción paracrina regula algunas funciones de las células de Sertoli como la formación de la barrera hematotesticular y la mitosis, inhibiendo la proliferación mediante la inducción de los inhibidores p21Cip1 and p27Kip1 del ciclo celular (Buzzard *et al.*, 2003b); además del desarrollo meiótico y post meiótico de las células germinales (Meng *et al.*, 2005).

Aunque inicialmente se pensó que los andrógenos influían positivamente en la proliferación de las células de Sertoli, estudios con ratones transgénicos demostraron la relación de éstos con la maduración de las células nodrizas; sin embargo, los mecanismos de regulación aún faltan esclarecer (Bremner *et al.*, 1994).

B) Regulación por factores de crecimiento y otras hormonas

- FGF, TGF α , EGF

Se ha aislado gran cantidad de factores de crecimiento en los testículos, siendo las células de Sertoli el principal tipo celular que presenta receptores en su superficie para la mayoría de dichos factores, tales como el factor de crecimiento fibroblástico (FGF-I, FGF-II), el factor de crecimiento insulínico (IGF-I, IGF-II), el factor de crecimiento transformante α (TGF α), entre otros. La producción y la acción del factor de crecimiento epidérmico (EGF) sobre las células de Sertoli no está claro; sin embargo, se obtuvo que la presencia de EGF en cultivos *in vitro* de células de Sertoli de rata estimulaba la producción de lactato e inhibía la producción de estradiol (Mallea *et al.*, 1986). En cuanto al factor de crecimiento transformante, es miembro de la familia del factor de crecimiento epidérmico, presenta la capacidad de unirse al receptor de EGF y tienen efectos similares en varios tipos celulares, además de presentar receptores específicos en las células de

Sertoli y las células peritubulares (Cupp y Skinner, 2001). Otro de los factores resaltantes es el FGF, el cual corresponde a una familia de siete polipéptidos, siendo los factores de crecimiento fibroblástico ácido (aFGF) y el básico (bFGF) los más conocidos ya que afectan tanto la actividad de aromatasa celular como la síntesis de proteínas específicas en cultivos primarios de células de Sertoli de animales inmaduros. Además, se ha reportado que la FSH estimula la producción de bFGF por células de Sertoli de rata y porcino, cuyos niveles disminuyen con la madurez sexual (Mullaney et al. 1992), mostrando una actividad mitogénica y de diferenciación sobre estas células y también sobre las células de Leydig (Han et al. 1993).

- IGF-I e insulina

El transporte de la glucosa, así como la estimulación de secreción de diversas sustancias como la transferrina, ABP (proteína ligadora de andrógenos) o el lactato, se llevan a cabo por la insulina o el factor de crecimiento insulínico (IGF-I). Si bien la acción entre ambas es parecida, para lograr un mismo efecto, se necesitan concentraciones distintas de éstas (Oonk y Grootegoed, 1987). El IGF-I actúa tanto en la proliferación como en la diferenciación celular, mostrando evidentes efectos en células de la granulosa, células mesenquimáticas, fibroblastos, células de Sertoli, y otras. Específicamente en las células de Sertoli, el IGF-I actúa estimulando el transporte de la glucosa, síntesis de ADN, la producción de lactato y la secreción de proteínas; mientras que la existencia de receptores para la insulina varía de acuerdo con las especies.

A su vez, en cultivos *in vitro* de células de Sertoli de rata y cerdo se obtuvo la producción de péptidos de IGF-I (Hall *et al.*, 1983; Ritzen, 1983; Tres *et al.*, 1986. Chatelain *et al.*, 1986a, b; Benahmed *et al.*, 1987), además de determinar la acción paracrina (señal de una célula que induce cambios en células vecinas) del IGF-I en espermátocitos paquiténicos, mas no en espermatogonias o espermátocitos en profase temprana (Tres *et al.*, 1986).

- Hormonas tiroideas T3 y T4

Estudios *in vivo* e *in vitro* con animales modelo demostraron que las hormonas tiroideas triyodotironina (T3) y tiroxina (T4) regulan las funciones de las células de Sertoli inmaduras. El efecto que provoca el hipotiroidismo en ratas recién nacidas es un aumento del tamaño testicular y producción espermática, lo que se correlaciona con el incremento numérico de las células de Sertoli y el retraso de la maduración de éstas (de Franca *et al.*, 1995). En contraposición, el hipertiroidismo (producción excesiva de las hormonas tiroideas) reduce el periodo de proliferación y favorece la maduración de las células de Sertoli. En resumen, análisis de los cultivos de estas células alimentadoras inmaduras demuestran que las hormonas tiroideas inhiben la mitosis celular estimulada por la FSH y la expresión de marcadores como la aromatasa y la hormona antimülleriana (AMH), mientras que estimulan la expresión de marcadores de maduración como la inhibina y clusterina (Meroni *et al.*, 2019).

2.2.4. Relación del número de células de Sertoli con el tamaño testicular, producción de espermatozoides y producción de células germinales

En especies como el porcino, las células de Sertoli son identificadas luego de la diferenciación sexual masculina aproximadamente 26 días post coito, existiendo una evidente prevalencia de dichas células frente a las espermatogonias durante las etapas fetal y postnatal hasta el inicio de la espermatogénesis en la pubertad, tiempo durante el cual los túbulos seminíferos solo contienen estos dos tipos celulares. Sin embargo, la relación numérica entre ellos se invierte con el inicio de la espermatogénesis debido a la rápida proliferación de las células germinales y el cese de la actividad mitótica de las células de soporte que da paso al proceso de diferenciación, el cual incluye la formación de la barrera hematotesticular (Pellinemi *et al.*, 1993).

Al igual que en los porcinos, las células de Sertoli de ratas, ratones, primates y otros mamíferos proliferan en la etapa prepuberal, por lo que estudios se han centrado en

evaluar las posibles relaciones de la producción del presente tipo celular, así como en los factores reguladores del periodo proliferativo (Migrenne *et al.*, 2012). Es así como se estableció una correlación entre el número de las células de Sertoli con la producción de espermatozoides y el tamaño testicular adulto, indicando que la cantidad de las células de Sertoli determina la madurez del tamaño testicular en diversas especies de mamíferos. Además, se sugiere una relación entre el número poblacional de las células de Sertoli establecidas durante el desarrollo perinatal y la producción del número normal de células germinales a desarrollarse llegada la pubertad. Esta premisa fue obtenida entre otros estudios, de una investigación con ratas recién nacidas a las cuales se les mermó la población de dichas células somáticas con un fármaco antimitótico (arabínósido de citosina), afirmando la importancia del periodo en el que se establece la población de células de Sertoli dado que influiría en el desarrollo normal de la espermatogénesis del adulto (Orth y Lamperti, 1988).

2.2.5. Métodos de aislamiento y reconocimiento

- Lectina DSA (*Datura stramonium agglutinin*)

El empleo de la lectina DSA es la técnica más común para el aislamiento de las células de Sertoli, el cual se basa en la unión específica entre ambas partes y la propiedad de adherencia de dichas células somáticas a soportes sólidos. Este método originalmente desarrollado por Scarpino ha sido estudiado en diferentes modelos animales y humanos demostrando eficacia y rapidez, por lo que se han implementado diversas modificaciones según la especie trabajada.

Las digestiones enzimáticas con la ruptura mecánica de los túbulos seminíferos dan como resultado agrupaciones de células de Sertoli asociadas a células mioides, Leydig y células germinales, principalmente. Dicho procedimiento seguido del uso de lectinas de DSA (*Datura stramonium agglutinin*), el cual se une específicamente a residuos terminales de azúcar como el oligómero N-acetil-D-glucosamina presente en grandes cantidades en las células de Sertoli (Crowley *et al.*, 1984), favorece el aislamiento

individual de estas células funcionales con un alto grado de pureza, como el obtenido de testículos de ratas inmaduras (Scarpino, 1998).

Dado que las células de Sertoli son capaces de adherirse a la base de las placas de cultivo previamente cubiertas con la lectina DSA, es factible su separación de las células germinales, las cuales permanecen en suspensión en el medio. Este proceso de eliminación de las células germinales gracias al uso de la lectina es de corta duración, a diferencia de otros métodos donde se requiere cultivos de varios días a elevadas temperaturas (Welsh y Wiebe, 1975) o que conste de tratamientos hipotónicos (Galdieri *et al.*, 1981). Además, estudios indican que con este método las células de Sertoli mantienen las características y funciones que presentan *in vivo*, con evidente respuesta a factores mitógenos; demostrando que la incubación con la lectina no daña la integridad de la membrana de las células de Sertoli (Scarpino, 1998).

- Reconocimiento de las células de Sertoli

El método más sencillo para la identificación de las células de Sertoli es mediante la examinación morfológica visualizada con microscopio óptico de contraste de fase; siendo una de las características más evidentes la morfología nuclear. Las células de Sertoli se encuentran apoyadas en la membrana basal, con características morfológicas variables ya que su estructura tridimensional cambia según el estadio de la espermatogénesis. Mediante el uso del microscopio óptico con contraste de fase se puede observar que en los cultivos *in vitro* presentan un crecimiento en monocapa característico de células epitelioides, el interior del núcleo es característico por su apariencia granular y por poseer un nucleolo tripartito prominente; además las células presentan un citoplasma extenso con gotas lipídicas, las cuales son más evidentes en las primeras etapas de cultivo y van haciéndose menos visibles conforme envejecen (Kodani y Kodani, 1966). Estudios mostraron que luego de las digestiones enzimáticas las células de Sertoli humanas cultivadas reflejan la pérdida de sus extensiones citoplasmáticas para adoptar una forma redonda con bordes crenados, pudiendo

confundirse en cierto grado con las células madre espermatogoniales. Sin embargo, dichas extensiones se vuelven a producir luego de 1-2 semanas de cultivo formando una monocapa de células aplanadas adheridas al fondo de la placa (Lakpour *et al.*, 2017).

La inmunocitoquímica es una técnica comúnmente empleada en la identificación de las células de Sertoli que hace uso de anticuerpos que reconocen moléculas presentes en dicho tipo celular como receptores para FSH presentes en la superficie celular; AMH (hormona anti-mulleriana) como un marcador específico de células de Sertoli inmaduras en la mayoría de las especies, así como en el hombre (Tran *et al.*, 1987); vimentina, proteína conocida de los filamentos intermedios presente durante todo el desarrollo de las células de Sertoli, incluida la etapa adulta; citoqueratina, otra proteína de los filamentos intermedios empleada como marcador de células de Sertoli inmaduras (Aumüller *et al.*, 1992); marcadores del núcleo celular como GATA4 (Viger *et al.*, 1998) y Sox9, un factor transcripcional localizado en el núcleo de células de Sertoli prepuberal y adulta que actúa como activador del gen de AMH y participa en el mantenimiento del desarrollo de éstas (Fröjdman *et al.*, 2000).

A pesar de que el uso de la lectina DSA es un método sencillo y rápido para el aislamiento de células de Sertoli, es posible que otras células con propiedades adherentes como los fibroblastos también queden aislados al fondo de las placas de cultivo, representando la principal desventaja de este método. Es por ello que, es importante el empleo de técnicas como inmunocitoquímica que permita identificar con precisión las células de Sertoli de las demás células somáticas.

3. Interacción células de Sertoli- células de la línea germinal

Las células de la línea germinal juegan un papel esencial para la adecuada maduración de los gametos masculinos. Por tanto, el proceso de espermatogénesis involucra una serie de factores de crecimiento y citoquinas que actúan de manera yuxtacrina y paracrina (Jégou, 1991; de Kretser *et al.*, 1998), muchas de las cuales son secretadas

por células de Sertoli que forman parte de las células testiculares y son consideradas el principal contribuidor en la regulación de las SSC (Dadoune, 2007).

El componente estructural fundamental de los túbulos seminíferos está conformado por las uniones estrechas (“tight junctions”) de las células de Sertoli, proporcionando un entorno tisular específico para el mantenimiento de las células madre espermatogoniales (Sprading *et al.*, 2001). Es así como, la adhesión célula-célula a través de estas uniones y las regulaciones paracrinas son las responsables de las interacciones entre las SSC y las células de Sertoli, siendo estas últimas las que secretan factores importantes que promueven la proliferación y diferenciación de las SSC (Kern *et al.*, 1995).

Uno de los factores secretados más resaltantes es el GDNF (factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales), actuando sobre las SSC, las cuales presentan receptores específicos denominados GFR- α 1 y c-Ret (Tadokoro *et al.*, 2002; Oatley *et al.*, 2004). Por años se propuso que este factor era necesario solo para la proliferación y mantenimiento *in vivo* (Yomogida *et al.*, 2003) e *in vitro* (Nagano *et al.* 1998; Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2003; Nagano *et al.*, 2003; Kubota *et al.*, 2004b; Aponte *et al.*, 2006) de las SSC como tal; sin embargo, se ha determinado que también es responsable de controlar el balance entre la autorrenovación y diferenciación de estas células mediante diferentes mecanismos, entre ellos la GDNF/FSH (Lamberti *et al.*, 2014; Tadokoro *et al.*, 2002). Otro de los factores necesario para la autorrenovación de las SSC es el EGF (factor de crecimiento epidermal) (Kubota *et al.*, 2004a) y la proteína SCF (stem cell factor), la cual actúa en las espermatogonias tipo A promoviendo su sobrevivencia y proliferación inmortalizada, uniéndose a receptores c-kit (receptor tirosin kinasa tipo III y marcador tumoral) presentes en diversos tipos celulares como las células de Leydig y espermatogonias (Loveland y Schlatt, 1997; Mauduit *et al.*, 1999). Además, estudios revelan que en co-cultivos *in vitro*, las células de Sertoli pueden producir el IGF-I (factor de crecimiento insulínico), TGF- α (factor de crecimiento transformante α) (Tajima *et al.*, 1995), activina A y la BMP4 (proteína morfogenética ósea 4), los cuales

promueven la diferenciación de las células madre espermátogoniales (Nagano *et al.*, 2003).

Un estudio reciente realizado por Xie X. y colaboradores demostró que en los co-cultivos, las células germinales se adhieren a las células somáticas formando grupos o “clumps”, logrando expandirse y aumentar en número para posteriormente dar inicio a la espermatogénesis. Esto confirmaría una vez más, que dicho proceso es producto de las interacciones a través de las uniones intercelulares, y no solo mediante señales paracrinas de las células de Sertoli (Xie *et al.*, 2020). Además, se ha determinado que la viabilidad de las células germinales se mantiene al ser cultivadas junto a las células de Sertoli (Steinberger y Steinberger, 1967; Parvinen *et al.*, 1983, 1984; Tres *et al.*, 1963); es decir, se logra mejorar la rápida disminución de la viabilidad de las células germinales que normalmente se presenta luego del proceso de aislamiento (Steinberger y Steinberger, 1966).

En resumen, estos datos parecen indicar que tanto las señales de las células vecinas (SSC-células de Sertoli) transmitidas mediante uniones *gap* u otras, y la secreción de factores de crecimiento pueden determinar el destino de las células madre, ayudando al mantenimiento de la pluripotencia y su autorrenovación, o cambiando el rumbo hacia la diferenciación. De esta manera, las colonias formadas no solo proliferan *in vivo*, sino que también son capaces de generar la espermatogénesis luego de la trasplante, técnica usada como estrategia terapéutica para tratar la infertilidad masculina.

4. Cultivo celular

4.1. Parámetros reguladores

El cultivo celular es una técnica que permite obtener células individuales a partir de un tejido, logrando expandirlas en un medio específico y a condiciones controladas, con el objetivo de estudiar la fisiología celular y analizar procesos como la división, metabolismo celular, interacciones célula-célula, interacciones con el medio ambiente o la generación de metabolitos de interés (Wang, 2006). Además de la composición

nutricional de los medios de cultivo que haga posible la proliferación de las SSC o de las células de Sertoli, es importante el control de determinados parámetros fisicoquímicos como la temperatura, el cual principalmente varía alrededor de los 37°C y resulta ser un factor clave para el adecuado crecimiento o la regulación del metabolismo celular (Watanabe y Okada, 1967). Otro parámetro que al igual que la temperatura es controlada por las incubadoras es el nivel de CO₂, importante por ser el elemento regulador del pH de los medios, siendo el bicarbonato el tampón más usado (sistema buffer compuesto por CO₂ – HCO₃). De esta manera, el sistema con presión parcial de 5% CO₂ y un ambiente húmedo influyen en el pH del medio, estabilizando el crecimiento celular, la actividad metabólica y la regulación transcripcional de los tipos celulares (Blombach y Takors, 2015).

4.2. Medios de cultivo

Se han desarrollado diferentes medios de cultivo, los cuales se clasifican según su composición. Entre ellos, los medios simples son aquellos que contienen los elementos básicos para el mantenimiento de las células; más tarde serían desarrollados los medios con composición definida como el medio basal Eagle compuesto de aminoácidos, proteínas y vitaminas en proporciones conocidas. Adicionalmente, se ha buscado optimizar las condiciones de cultivo para cubrir las necesidades específicas de los diferentes tipos celulares, siendo la inclusión de los factores de crecimiento y el suero animal, los responsables de la aceleración y/o diferenciación del crecimiento celular (Yao y Asayama, 2017).

Los medios de cultivo más empleados son el DMEM, DMEM/F12 y StemPro para cultivos de SSC de animales domésticos; son isotónicos y deben tener la capacidad amortiguadora de pH para un correcto desarrollo celular *in vitro*. También contienen una serie de aminoácidos; sales inorgánicas que mantienen el balance osmótico y pueden actuar como cofactores en diversas reacciones enzimáticas; glucosa como fuente

energética; vitaminas capaces de actuar como antioxidantes al mantener bajos los niveles de las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas por el metabolismo celular y que en niveles elevados afectaría las funciones normales de las organelas, desencadenando en la muerte celular; además las vitaminas también promueven el crecimiento celular, siendo los más empleados las del complejo B como la riboflavina, tiamina, la vitamina C o ácido ascórbico y la vitamina E o α -tocoferol; proteínas y lípidos; además de ser suplementadas con aminoácidos como la L-glutamina, precursor de las purinas y pirimidinas de los ácidos nucleicos y el piruvato de sodio como una fuente adicional de carbohidratos (Yao y Asayama, 2017).

Aunque se han establecido sistemas de cultivo para SSC de ratón, el manejo de cultivos para células madre de animales domésticos es más complejo, siendo el suero uno de los principales suplementos por ser una fuente importante de factores de adhesión y factores de crecimiento como GDNF, FGF y EGF (Bedford-Guaus *et al.*, 2017), siendo el suero bovino fetal el más empleado. Es una mezcla indefinida que contiene polipéptidos, factores de crecimiento, hormonas estimuladoras de la proliferación celular, proteínas de unión, inhibidores de proteasas usadas para inhibir la acción de la tripsina y evitar el daño de las células luego de ser disociadas, entre otros. Además, se ha encontrado que concentraciones altas de éste inicialmente promueven la formación de colonias de SSC de ratón, así como la estimulación de células de Sertoli, el cual a medida que el crecimiento de este último tipo celular aumenta, se inhibe la propagación de las SSC (Bahadorani *et al.*, 2012). Es por esta razón que se considera el uso del suero a diferentes concentraciones en el cultivo de las células de Sertoli, teniendo en cuenta las especies de animales a trabajar.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis

- ✓ El uso de las gradientes discontinuas de Percoll enriquece la población de células madre espermatozonales (SSC) de alpaca y el co-cultivo con células de Sertoli brinda el soporte necesario para la sobrevivencia y proliferación de las SSC en un sistema de cultivo de corto plazo.

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

- ✓ Desarrollar un protocolo empleando gradientes de Percoll que permita enriquecer la baja población de las SSC de alpacas, e implementar co-cultivos con células de Sertoli en cultivos de corto plazo.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Optimizar el proceso de enriquecimiento por las gradientes de Percoll mediante la obtención de concentraciones apreciables de SSC producto del aislamiento enzimático.
- ✓ Implementar un protocolo de aislamiento de células de Sertoli de alpaca que sea sencillo y rápido de reproducir.
- ✓ Lograr una proliferación apta de células de Sertoli en cultivo para que puedan ser co-cultivadas con las SSC enriquecidas.
- ✓ Conocer el comportamiento de las SSC en cultivos de corto plazo con y sin células de Sertoli.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1. Material biológico

Testículos de 20 alpacas adultas sacrificadas en el Camal Municipal de Huancavelica y transportadas en suero fisiológico más antibióticos a 4°C hasta el laboratorio de Fisiología de la Reproducción (LFR) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Lima), luego de aproximadamente 24h post mortem del animal (Figura 7).



Figura 7. Muestras biológicas. A la izquierda se observa la caja de envío donde son transportadas las muestras de trabajo (testículos de alpaca). A la derecha, los pares de testículos limpiados y lavados con suero.

1.2. Material de laboratorio

1.2.1. Medios de lavado, aislamiento, cultivo celular y reactivos

A) Suero más antibióticos para el transporte y lavado de las muestras testiculares:

NaCl 0.9%, Penicilina 0.1 mg/ml (Sigma-Aldrich, cat. no. P3032) y Estreptomicina 10 mg/ml (Sigma-Aldrich, cat. no. S9137), Gentamicina 0.1 mg/ml (Sigma - Aldrich, cat. no. G1264).

- B) Medio de aislamiento de espermatozoides: 9.8 g/L Ham F-10 (Sigma-Aldrich, cat. no. N6635) suplementado con Bicarbonato de sodio 2.1 g/L (Sigma-Aldrich, cat. no. S5761), Lactato de calcio 0.245 g/L (Sigma-Aldrich, L4388), Penicilina 0.075 g/L, Estreptomicina 0.075 g/L y BSA 0.4% (Sigma-Aldrich, A3311), disuelto en agua ultrapura.
- C) Medio de aislamiento de SSC: MEM (Minimum Essential Medium Eagle) (Sigma-Aldrich, cat. no. M4655) suplementado con Penicilina 0.1 mg/ml, Estreptomicina 0.1 mg/ml, y BSA 0.4% (4 mg/ml).
- D) Medio de aislamiento de células de Sertoli: Hank's Balanced Salt Solution libre de Ca^{+2} y Mg^{+2} (Sigma-Aldrich, cat. no. H9394) suplementado con Penicilina 0.1 mg/ml, Estreptomicina 0.1 mg/ml y BSA 0.4% (4 mg/ml).
- E) Medios de digestión enzimática: Medio de aislamiento de SSC o de células de Sertoli más enzimas de digestión Hialuronidasa Tipo I (0.5 mg/ml) (Sigma-Aldrich, cat. no. H3506), Colagenasa Tipo V (1 mg/ml) (Sigma-Aldrich, cat. no. C9263) y DNasa Tipo II (2,6 $\mu\text{l/ml}$) (Sigma-Aldrich, cat. no. D4527) (Enzima 1); y Hialuronidasa Tipo I (0.5 mg/ml) y Colagenasa Tipo V (1 mg/ml) (Enzima 2).
- F) Gradiente de densidad Percoll para la purificación de las SSC: Las fracciones de 40%, 30% y 20% se prepararon a partir de Percoll 100% [90% Percoll puro y 10% (NaCl 1.5M + HEPES 0.024 g/ml + Penicilina 0.5 mg/ml + Estreptomicina 0.5 mg/ml)], empleando como medio dilutor NaCl 0.15M + HEPES 0.0024 g/ml + Penicilina 0.05 mg/ml + Estreptomicina 0.05 mg/ml. El Percoll Plus empleado fue apto para cultivo celular, con densidad de 1.130 g/ml, muy baja toxicidad, osmolalidad y viscosidad (Sigma-Aldrich, cat. no. E0414).

- G) Medio de cultivo de SSC: Medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma-Aldrich, cat. no. D5796) suplementado con SBF 1% (Sigma-Aldrich, cat. no. F4135), BSA 0.5% (5mg/ml) (Sigma-Aldrich, cat. no. A3311), MEM vitamin solution 1% (Gibco™ Thermo Fisher Scientific, cat. no. 11120-052), Piruvato de sodio 0.03 g/ml (Sigma-Aldrich cat no. P5280), Aminoácidos no esenciales 1% (Sigma-Aldrich, cat. no. M-7145), L-glutamina 0.29 mg/ml (Sigma - Aldrich cat no. G8540), Penicilina y Estreptomicina 0.1 mg/ml, Ácido láctico 0.1% (Sigma-Aldrich, cat. no. 1375), Insulina transferrina- Selenito de sodio 0.1% (Sigma-Aldrich, cat. no. I-1884), (+)- α Tocoferol 0.1% (Sigma-Aldrich, cat. no. T1539), Gentamicina 0.1% y Suero de leche materna 1%.
- H) Medio de cultivo de las células de Sertoli: Medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma-Aldrich, cat. no. D5796) suplementado con SBF 10%.
- I) Buffer Dulbecco's para la concentración celular: Buffer Fosfatado Salino Dulbecco's 9.6g/L (Sigma-Aldrich, cat. no. D5773), Cloruro de calcio 0.1g/L (Sigma-Aldrich, cat. no. C1016), Penicilina 0.075g/L, Estreptomicina 0.075g/L y Heparina sódica 2ml.
- J) PBS 1X: NaCl 8mg/ml (Sigma-Aldrich, cat no S5886), KCl 0.2mg/ml (Sigma-Aldrich, cat. no. P9333), Na_2HPO_4 1.6mg/ml (Sigma-Aldrich, cat no. S5136), KH_2PO_4 0.24mg/ml (Sigma-Aldrich, cat. no. P5379), Penicilina 0.1mg/ml, Estreptomicina 0.1mg/ml, a pH 7.4.
- K) Solución fijadora: Metanol 80% (Merck) + (PBS 1X + 0.1% BSA) 20%. Esta solución no se filtra y se mantiene almacenado a -20°C.

L) Lectina DSA (*Datura stramonium agglutinin*): La presentación de 1 mg de DSA liofilizado (Sigma-Aldrich, cat. no. L2766) fue disuelto en 500 µl PBS, pH 6.8. Para el aislamiento de las células de Sertoli se empleó una concentración de 5 µg/ml en 1ml de medio DMEM + 10% SBF.

M) Reactivo para el marcaje de las SSC por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia: Conjugado DBA-FITC (EY Laboratories, F-1201-5).

N) Colorante vital: Azul de tripán (Sigma-Aldrich, cat. no. T6146) al 0.04% en PBS.

Todos los medios y soluciones, a excepción de la solución fijadora, fueron filtradas con filtro Millipore 0.22 µm (Millex-GV; Merck). Además, los medios de aislamiento y cultivo celular fueron puestos a 37°C, 5% CO₂ un día antes de ser empleados.

1.2.2. Insumos y equipos de laboratorio

Se emplearon Microtubos cónicos de 1.5ml, 0.6ml y 0.2ml, Tubos cónicos de polipropileno de 15ml y 50ml, Placas Petri, Placas de cultivo celular de poliestireno 12 pocillos (SPL Life Science), Puntas de micropipeta de 10µl, 100µl y 1000µl, frascos de vidrio de borosilicato Pyrex, jeringas de 10ml y 20ml, tijeras de metal gruesas y finas, rejillas metálicas, pinzas gruesas, láminas portaobjetos, cubreobjetos, cámara de Neubauer, filtros Millipore 0.22µm, guantes de nitrilo y gasas.

Los materiales de metal y de vidrio fueron autoclavados a 121°C antes de su uso.

Los equipos empleados fueron Incubadora de CO₂ Forma Series II (Thermo Scientific), Centrifuga 5424-R de 24 tubos (Eppendorf), Cámara de flujo laminar Labconco, Microscopio óptico, Microscopio invertido, Microscopio de Fluorescencia AJ43 Seitz, Citómetro de flujo AMNIS, Autoclave y Balanza analítica.

2. Métodos

2.1. Colección de las muestras

Se emplearon 20 pares de testículos de alpacas adulta sacrificadas en el Camal Municipal de Huancavelica, los cuales fueron evaluados en el laboratorio de Fisiología de la Reproducción de la Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM (Lima) luego de aproximadamente 24h post mórtem. Dichas muestras biológicas fueron transportadas en suero fisiológico más antibióticos a una temperatura aproximada de 4°C.

Se extrajo el epidídimo de cada una de las muestras testiculares y se liberaron los espermatozoides en medio HAM F-10 mediante cortes con tijeras finas. Para el proceso de aislamiento de las células madre espermatogoniales (SSC) se seleccionaron los pares de testículos con peso promedio mayor a 8g y con los mejores valores de concentración, movilidad, host y viabilidad espermática, evaluados de acuerdo con los parámetros establecidos por la Organización Mundial de la Salud (WHO, del inglés *World Health Organization* 2010).

2.2. Aislamiento de células testiculares- células madre espermatogoniales

Los testículos seleccionados fueron lavados en suero más antibióticos, se decapsularon mediante la liberación de la túnica albugínea, y diseccionaron tres trozos de tejido por animal, de aproximadamente 0.8g cada uno. Estos se colocaron en una rejilla metálica y fueron cortados con tijeras finas estériles para liberar los túbulos seminíferos.

La suspensión celular obtenida por la adición de 3ml de medio de aislamiento MEM a los trozos de tejido fue recogida en una placa Petri y se trasvasó a tres microtubos cónicos de 1.5ml. Estos fueron centrifugados a 1500rpm, 37°C por 5 minutos y se lavaron con 1ml de medio por tubo, centrifugada a la misma revolución y temperatura por 10 minutos.

El pellet resultante pasó por dos digestiones enzimáticas (Enzima 1 y Enzima 2) con agitación constante dada por un rotador e incubadas a 37°C, durante 30 y 20 minutos respectivamente. Luego de cada digestión, la suspensión celular fue centrifugada por 5

minutos y lavada una vez luego de la primera digestión (10 minutos, 1500 rpm) y dos veces luego de la segunda digestión enzimática, cada una de 5 minutos y a la misma revolución. Finalmente, las células testiculares aisladas fueron resuspendidas en 1ml de medio de aislamiento por animal, de donde se tomaron alícuotas para la evaluación de la viabilidad y concentración celular. Calculada la concentración, se sembró 1mill/1.5ml de células por pocillo en medio DMEM (cultivo control), se separó 1 millón para la evaluación mediante microscopía de fluorescencia (en fresco), 1 millón para la fijación, y se cargaron entre 7 y 45 millones de células en las columnas de Percoll por muestra, con un máximo de 28 millones de células por columna.

El procedimiento se realizó dentro de la cámara de flujo laminar con el objetivo de mantener completa esterilidad (Anexo 1).

2.3. Purificación y enriquecimiento de las células madre espermato goniales (SSC) mediante la gradiente de densidad Percoll

Las gradientes de densidad Percoll se prepararon en microtubos cónicos de 1.5ml, donde se cargaron 300µl de cada fracción de mayor a menor densidad (40%, 30% y 20%). Se calculó el volumen de 7-28 millones de células redondas de la suspensión celular producto de las digestiones enzimáticas, para luego ser agregada lentamente en la parte superior de la gradiente y centrifugada a 2500rpm durante 25 minutos a temperatura ambiente. Se recogió el anillo formado entre las fracciones de 30% y 20% de densidad, sección donde se encuentran las SSC (Figura 8) y se lavó dos veces con el medio de aislamiento MEM a 1500 rpm por 5 minutos, siendo el primer lavado a temperatura ambiente con el fin de retirar el Percoll excedente, y el segundo lavado a 37°C con el objetivo de mantener la viabilidad celular. Finalmente, se resuspendió en 1ml o 500µl de medio (dependiendo de la turbidez de cada muestra) y se tomaron alícuotas para la evaluación de la viabilidad con azul de tripán y concentración celular. Se separó 1 millón de células madre espermato goniales para la evaluación en fresco por microscopía de fluorescencia y 1 millón de células para la fijación.

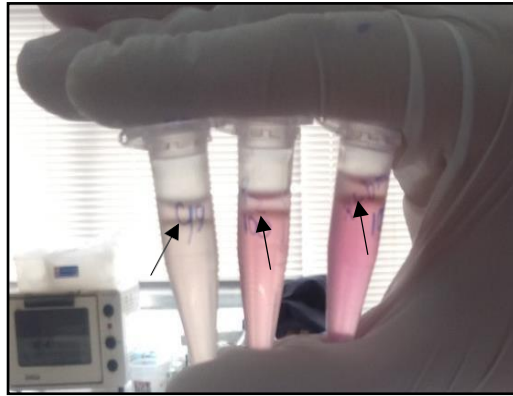


Figura 8. Formación del anillo de SSC en las gradientes de Percoll señaladas mediante flechas

2.4. Determinación de la viabilidad y concentración celular

La viabilidad fue evaluada mediante la adición de 2µl de Azul de Tripán a 10µl de la suspensión colocada previamente en una lámina portaobjetos (control o post percoll); y para la determinación de la concentración celular en la cámara de Neubauer (grupo control o post percoll) se tomó otra alícuota de 10µl y se resuspendió en 990µl de Buffer Dulbecco's.

2.5. Fijación celular

Las suspensiones celulares que pasaron por el proceso de fijación fueron lavadas con 500µl de PBS + 0.1% BSA a fin de retirar el medio circundante, siendo centrifugadas por 5 minutos a 2500rpm y 37°C. Al pellet obtenido se le agregó 500µl de la solución fijadora (gota a gota y por las paredes del microtubo) y se incubó a -20°C por 15 minutos. Transcurrido el tiempo, estas suspensiones fueron centrifugadas por 5 minutos a 2500 rpm y 4°C para luego lavarlas dos veces a las mismas condiciones con 500µl de PBS + 0.1% BSA y resuspenderlas en 500µl de esta misma solución. Finalmente, las muestras fijadas se rotularon y almacenaron a 4°C hasta el momento de su lectura por citometría de flujo o microscopía de fluorescencia.

2.6. Cultivo de SSC control y post percoll

Para ambos grupos de trabajo se cultivaron 1×10^6 de células por pocillo en 1.5ml de medio de cultivo DMEM a 37°C y 5% CO₂ durante 8 días, siendo alimentadas periódicamente cada 2 o 3 días dependiendo del crecimiento celular (Figura 9). A su vez, se tomaron fotos de los cultivos con el microscopio invertido (Figura 10), y se sacaron alícuotas para evaluar la viabilidad y concentración de cada muestra. Luego de 8 días de cultivo, se fijaron 1×10^6 de células de cada tratamiento para el posterior análisis por citometría de flujo o microscopía de fluorescencia.



Figura 9. Cultivos celulares a 37°C

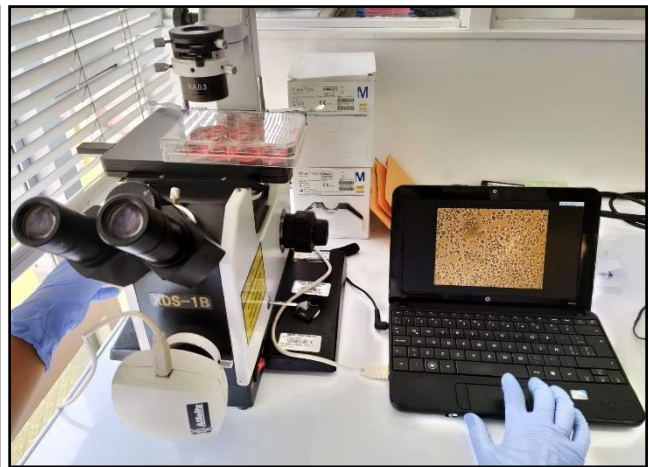


Figura 10. Seguimiento de los cultivos celulares

2.7. Aislamiento y cultivo de células de Sertoli

El aislamiento constó de dos digestiones enzimáticas, similar al aislamiento de células madre espermato goniales. Para este caso, se diseccionó un cuarto trozo de los testículos y se empleó 1ml de medio Hanks' Balanced Salt Solution (suplementado con antibióticos y BSA 0.4%) para cada lavado, y 1ml de cada uno de los medios de digestión enzimático. Finalmente, la suspensión celular obtenida fue resuspendida en 500µl de medio Hank's y se tomó una alícuota para calcular la concentración de células redondas (Anexo 1). Previamente se preparó la placa de cultivo, donde los pocillos fueron cubiertos con la lectina DSA (*Datura stramonium agglutinin*) a concentración de 5 µg/ml en 1ml de medio de cultivo DMEM + 10%SBF e incubado a 37°C, 5% CO₂ por 1-2h.

Luego, se agregó 1×10^6 de células testiculares (grupo control) para ser cultivadas durante 28h; transcurrido el tiempo se retiró el sobrenadante y el pocillo se lavó una vez con el mismo medio. Finalmente, se agregó 500ul de DMEM + 10%SBF, dejándolo en cultivo a 37°C, 5% CO₂ durante 1-3 semanas hasta lograr aproximadamente el 90% de confluencia y cambiando el medio periódicamente cada 2 o 3 días.

2.8. Co-cultivo de las SSC enriquecidas con células de Sertoli

Una vez alcanzado aproximadamente el 90% de confluencia en el crecimiento de las células de Sertoli se lavó con medio DMEM + 10%SBF y a ello se le agregó 1×10^6 de células del cultivo de SSC post percoll en 500 µl de medio DMEM fresco. Paralelamente se dejó en cultivo 1×10^6 de SSC post percoll en medio DMEM, representando el control del co-cultivo.

Ambos grupos (SSC post percoll + células de Sertoli y SSC post percoll sin células de Sertoli) fueron evaluados por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia luego de 1-3 semanas de cultivo.

2.9. Identificación de las SSC mediante el marcaje con el conjugado DBA-FITC

Las técnicas de microscopía de fluorescencia y citometría de flujo se emplearon en la evaluación de la suspensión celular obtenida de las digestiones enzimáticas (control), la purificación por las gradientes de Percoll (post percoll), sus respectivos cultivos de 8 días, los co-cultivos con las células de Sertoli y sus respectivos controles (SSC purificadas por las gradientes discontinuas y cultivadas sin células de Sertoli).

En todos los casos se empleó 1.5µl del conjugado DBA-FITC marcador de células madre, el cual se incubó con 1 millón de células de cada una las suspensiones (frescas o fijadas) a 37°C durante 15 minutos y en completa oscuridad. Se centrifugó a 2500rpm por 5 minutos, y a las mismas condiciones se lavó dos veces con 200ul de Buffer Dulbecco's + 0.4% BSA con el fin de retirar el excedente del marcador fluorescente.

Finalmente, se resuspendió en el mismo buffer y se prosiguió a la evaluación en completa oscuridad por microscopía de fluorescencia o citometría de flujo. Para el caso de las suspensiones celulares fijadas se realizó un lavado previo con 200µl de Buffer Dulbecco's + 0.4% BSA.

Para la evaluación en el microscopio de fluorescencia se añadió 10µl de la suspensión celular en una lámina portaobjetos y se registraron fotos. En campo oscuro se encontró que solo las SSC son marcadas con el conjugado DBA-FITC dando una fluorescencia verde; y en campo claro se evidencia el total de células testiculares. Tomando en cuenta lo mencionado, se evaluó el porcentaje de las SSC marcadas de un total aproximado de 200 células redondas, diferenciándose las tres poblaciones de acuerdo con el estudio de Valdivia *et al.* 2019a (sDBA+, wDBA+ y DBA-) (Figura 11).

Por otro lado, se analizaron 10000 eventos por muestra en el citómetro de flujo AMNIS, usando una longitud de onda de excitación de 488nm y 20mW. Se seleccionó la población de células redondas (recuadro verde) y de igual manera se clasificaron según la intensidad de fluorescencia emitida, siendo las strong DBA positivas (sDBA+) las SSC, las weak DBA positivas (wDBA+) las SSC en diferenciación temprana y las DBA negativas (DBA-) las células diferenciadas, siguiendo las pautas del trabajo de Valdivia *et al.* 2019a (Figura 12).

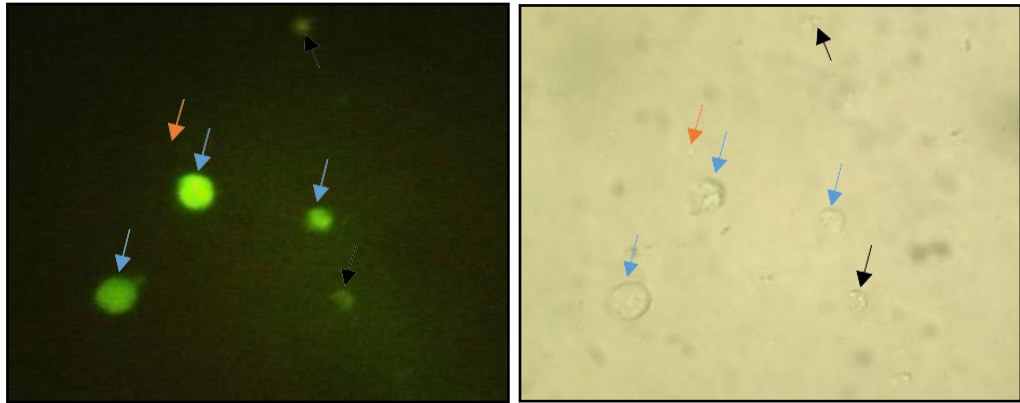


Figura 11. Evaluación por microscopía de fluorescencia. Células strong (sDBA+) con fuerte fluorescencia (flechas celestes), células weak (wDBA+) con débil fluorescencia (flechas negras) y células sin fluorescencia (DBA-) (flecha roja)

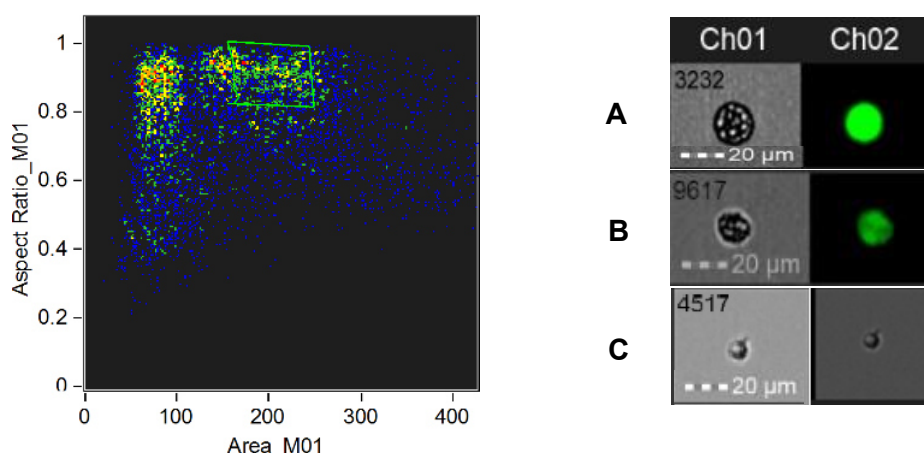


Figura 12. Evaluación por citometría de flujo. A la izquierda se observa el ploteo del total de células testiculares, con la selección de las células redondas en recuadro verde. A la derecha se muestra la clasificación de la población de las células redondas seleccionadas según la intensidad de su fluorescencia. A. strong DBA+ (sDBA+); B. weak DBA+ (wDBA+); C. células sin afinidad por el marcador de células madre (DBA-)

2.10. Identificación de las células de Sertoli

Las células de Sertoli fueron visualizadas por contraste de fase, identificando que en el inicio de su crecimiento estas presentaban forma casi redonda, adheridas firmemente a la base de los pocillos de la placa y adoptando progresivamente su forma alargada, con expansión de sus prolongaciones filamentosas. Además, se evidenció la morfología nuclear de estas células somáticas, observándose como pequeños gránulos.

2.11. Análisis estadísticos

Se utilizó el Software IBM SPSS Statistic v23 para comparar el número de SSC del aislamiento enzimático y la purificación de éstas mediante las gradientes de Percoll (frescas y cultivadas) analizadas mediante las técnicas de citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. Si las variables siguen una distribución normal, se emplea la prueba de T-student para muestras relacionadas y en caso no se cumpla la distribución normal, se emplea la prueba de Wilcoxon como prueba no paramétrica.

RESULTADOS

1. Evaluación de parámetros espermáticos

Previo al aislamiento de las células madre espermátogoniales, se evaluaron los parámetros espermáticos de movilidad, concentración, viabilidad y test de host de 20 pares de muestras testiculares de alpaca con pesos promedio mayores a 8g. Se seleccionaron aquellos con los mejores valores, obteniendo una media de la movilidad espermática de 52.74%, concentración promedio de 233.15×10^6 espermatozoides/ml, 66.52% en cuanto a la viabilidad y 64.04% como valor promedio de la prueba Host, en donde se evaluó la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide. Además, se puede observar una gran variedad de valores para cada parámetro evaluado, existiendo notable diferencia entre los valores máximo y mínimo (Tabla 1, Anexo 2).

Tabla 1. Parámetros espermáticos de las 20 muestras testiculares evaluadas

	<i>Media \pm SD</i>	<i>Valor Mínimo</i>	<i>Valor Máximo</i>
<i>Movilidad espermática (%)</i>	52.74 \pm 13.36	24.66	81.13
<i>Concentración espermática (mill/ml)</i>	223.25 \pm 132.31	40	450
<i>Viabilidad espermática (%)</i>	66.52 \pm 12.29	35.83	84.46
<i>Test de Host (%)</i>	64.04 \pm 12.81	37.89	91.83

2. Evaluación de la viabilidad y concentración de las SSC de la suspensión de células testiculares (Grupo Control)

Luego del aislamiento enzimático se evaluó la concentración y viabilidad de células redondas, entre las cuales se encontrarían las células madre espermátogoniales. La media de la concentración fue de 71.26 millones/ml, teniendo como valor mínimo 14

millones/ml y valor máximo 143 millones/ml; y la media de la viabilidad inicial (grupo control) fue del 92.59%, registrado en base al conteo de aproximadamente 200 células por muestra (Tabla 2, Anexo 3).

Tabla 2. Valores de concentración y viabilidad inicial de las SSC (Grupo Control)

	<i>Media ± SD</i>	<i>Valor Mínimo</i>	<i>Valor Máximo</i>
<i>Concentración celular [mill/ml]</i>	71.26 ± 34.03	14	143
<i>Viabilidad inicial (%)</i>	92.59 ± 6.92	75.30	99.20

3. Evaluación de las distintas fases formadas en las columnas de Percoll

Se evaluaron alícuotas de las distintas fases de las columnas de Percoll con Azul de tripán con el objetivo de identificar la posición de las SSC.

En la fase superior al anillo se observaron muy pocas células redondas y debris; en cambio, en la fase inferior al anillo se observó gran cantidad de espermatozoides y glóbulos rojos, además de algunas células redondas. En la alícuota extraída del anillo se encontró una gran población de células redondas, las cuales serían evaluadas posteriormente mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia afirmando ser la población purificada de células madre espermátogonias (Figura 13).

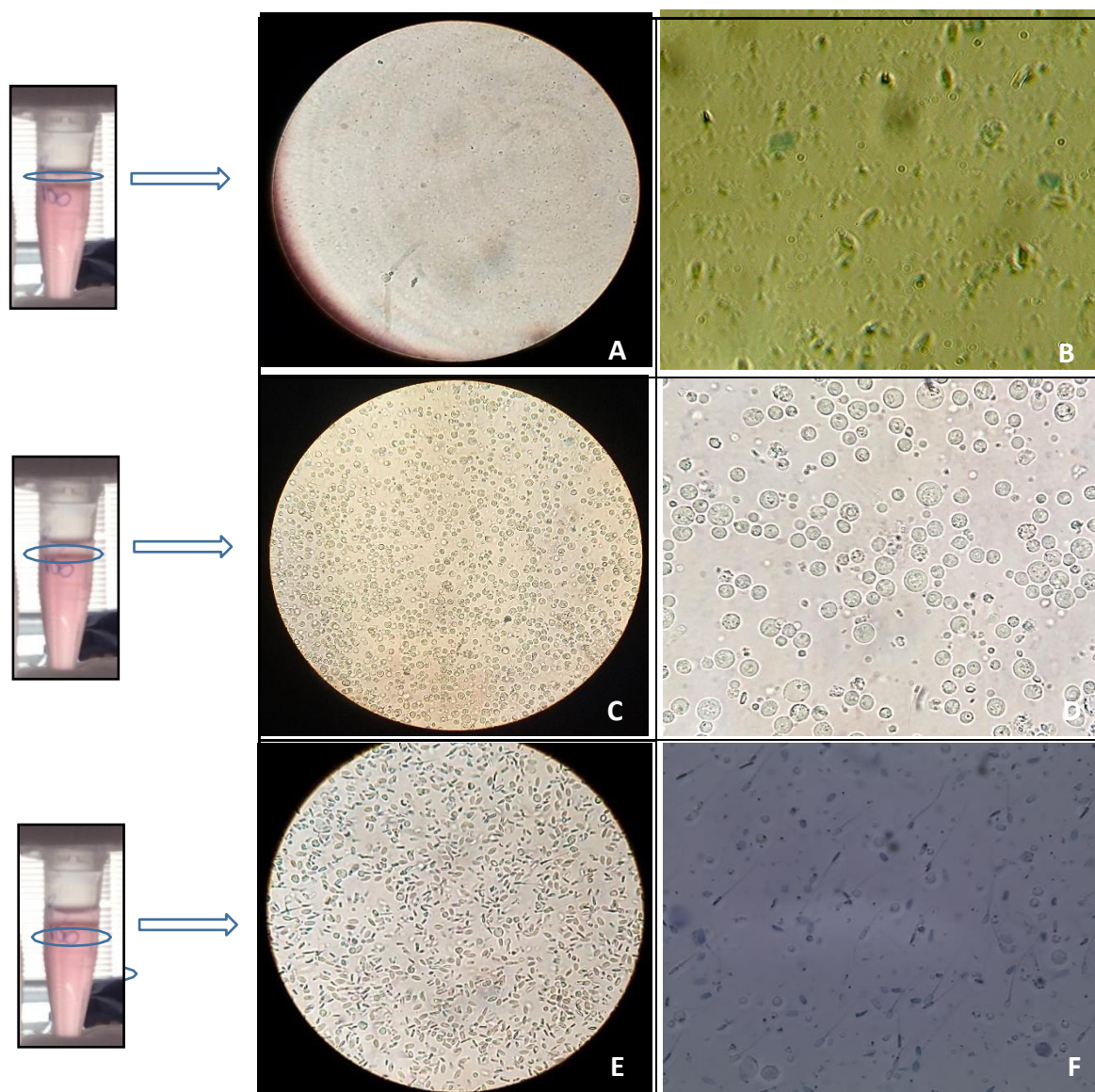


Figura 13. Vistas de las distintas fases formadas en la purificación de las SSC mediante las columnas de Percoll, usando Azul de Tripán. A y B. Vista de la fase superior de la columna, con pocas células redondas y debris. C y D. Vista del anillo formado entre las fases de densidad 20% y 30% donde se observan las SSC. E y F Vista de la fase inferior de la columna, con gran cantidad de espermatozoides, glóbulos rojos y células muertas.

4. Evaluación de la viabilidad, concentración y enriquecimiento de las células purificadas mediante las gradientes de Percoll

La media de la viabilidad y de la concentración de las células madre espermato goniales purificadas mediante las gradientes de percoll fue de 92.47% y 14.43 millones/ml respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3. Valores de concentración y viabilidad post percoll de las SSC (Grupo Post Percoll)

	<i>Media ± SD</i>	<i>Valor Mínimo</i>	<i>Valor Máximo</i>
<i>Concentración celular [mill/ml]</i>	14.43 ± 8.30	5.4	32.6
<i>Viabilidad post percoll (%)</i>	92.47 ± 5.79	72.3	99.1

El porcentaje de SSC recuperadas se evaluó dividiendo la cantidad de células del anillo formado en las gradientes de percoll y el número de células redondas producto de las digestiones enzimáticas que fueron cargadas en las gradientes de densidad (Tabla 4), obteniendo una media de 46.04 ± 20.93 % y alcanzando una máxima recuperación del 81.50% de SSC (Tabla 4, Tabla 5).

Tabla 4. Recuperación de las SSC mediante las gradientes de Percoll

	CONTROL		POST PERCOLL		
Muestras	Concentración inicial de SSC [mill/ml]	Células cargadas en las gradientes (millones)	Concentración post percoll de células [mill/ml]	Células del anillo (millones)	SSC recuperadas (%)
97- 19	14	7	10,8	5,4	77,14
100- 19	123	36,9	8,4	8,4	22,76
127- 19	44	13,2	21,4	10,7	81,06
129- 19	65	19,5	12,3	6,2	31,79
131- 19	94	28,2	7,4	7,4	26,24
5- 20	26,1	31,3	24,6	24,6	78,59
14- 20	110	20	32,6	16,3	81,50
20- 20	49	39,2	23,4	23,4	59,69
22- 20	54	43,2	25,7	25,7	59,49
24- 20	93	27,9	9,7	9,7	34,77
30- 20	82	41	19,3	19,3	47,07
35- 20	143	42,9	25,2	25,2	58,74
37- 20	60	36	11,8	11,8	32,78
38- 20	111	44,4	12	12	27,03
44- 20	53	21,2	5,4	5,4	25,47
45- 20	64	22,4	9,4	9,4	41,96
46- 20	79	23,7	5,4	5,4	22,78
52- 20	85	25,5	12,2	12,2	47,84
56- 20	46	23	5,7	5,7	24,78
57- 20	30	15	5,9	5,9	39,33

* Los números 19 y 20 indican el año en el que se trabajó la muestra (2019-2020)

Tabla 5. Media del porcentaje de recuperación de las células madre espermatozonales

	<i>Media ± SD</i>	<i>Valor Mínimo</i>	<i>Valor Máximo</i>
<i>Recuperación de las SSC (%)</i>	46.04 ± 20.93	22.76	81.50

5. Comparación entre las viabilidades inicial y post percoll

Las viabilidades celulares producto del aislamiento enzimático y la purificación con las gradientes fueron mayores al 70%, donde las células muertas son aquellas coloreadas de azul ya que al tener dañada la membrana celular estas permitieron la entrada del colorante; caso contrario, las células vivas se vieron transparentes (Figura 14).

Las medias de las viabilidades inicial y post percoll fueron $92.59 \pm 6.92 \%$ y $92.47 \pm 5.79 \%$ respectivamente (Tabla 6), lo cual podría indicar que el empleo de las gradientes discontinuas de Percoll no afectaría en gran medida la integridad de las membranas celulares.

Los valores de la viabilidad de las células redondas del grupo Control y grupo Post Percoll se muestran en el Anexo 3.

Tabla 6. Comparación de las medias de las viabilidades de las SSC iniciales y post percoll

	<i>Viabilidad inicial (%)</i>	<i>Viabilidad post percoll (%)</i>
<i>Media ± SD</i>	92.59 ± 6.92	92.47 ± 5.79
<i>Valor Mínimo</i>	75.3	72.3
<i>Valor Máximo</i>	99.2	99.1

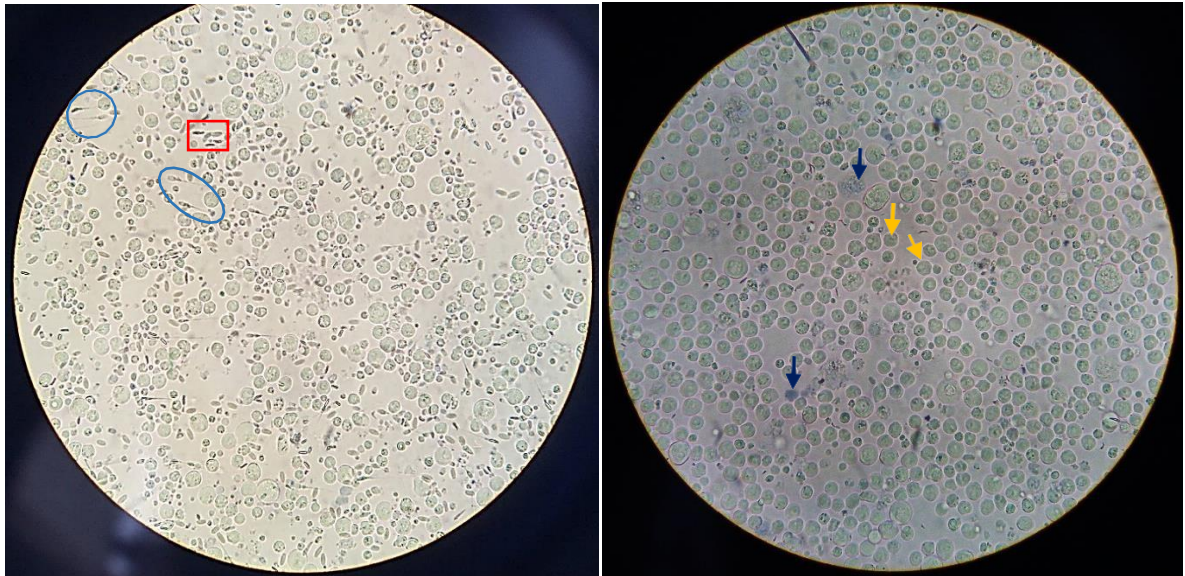


Figura 14. Viabilidades celulares con Azul de Tripán. A la izquierda se observa la viabilidad inicial (luego de las digestiones enzimáticas) y a la derecha, la viabilidad post percoll. La tinción diferencial permite distinguir las células vivas (transparentes, flechas amarillas) de las células muertas (azules, flechas azules); además en el pool de células testiculares también se observaron glóbulos rojos (recuadro rojo) y espermatozoides (elipses celestes).

Para conocer si el uso de las gradientes de Percoll daña significativamente las células espermatogoniales se empleó la prueba de Wilcoxon como prueba no paramétrica, luego de haberse demostrado que las muestras no siguen una distribución normal. Para ello, se analizaron los valores obtenidos de la prueba Shapiro-Wilk, ya que el número de muestra trabajado es menor a 30 (Anexo 4).

Se demuestra que el presente estudio es longitudinal y las muestras son relacionadas puesto que a las mismas muestras se les evalúa las viabilidades antes y después del empleo de las gradientes de Percoll. Debido a ello se analizó el estadístico de Wilcoxon, donde se obtuvo un p_value de 0.794 ($p > 0.05$), demostrándose que no existe diferencia significativa entre las viabilidades iniciales y post percoll (Anexo 5).

6. Comparación de los porcentajes de SSC del Grupo Control y Post Percoll evaluados mediante Citometría de Flujo

Se evaluaron ambos tratamientos (grupo control y post percoll) de 8 muestras mediante citometría de flujo. El marcaje con el conjugado DBA-FITC de la suspensión celular obtenida de las digestiones enzimáticas (grupo control) dio una media de $37.02 \pm 29.21\%$ de células con fuerte afinidad al DBA (sDBA+), representando a la población de células madre espermatogoniales. El rango de valores porcentuales de SSC de las muestras control fue muy amplio, llegando a obtener un valor máximo de 85.30% (Tabla 7). La media de células sDBA+ del grupo control ($37.02 \pm 29.21\%$) comparado a la media porcentual de SSC purificadas por las gradientes del Percoll ($62.46 \pm 33.15\%$) presentó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), evaluación dada mediante la prueba T para dos muestras relacionadas. De igual manera se encontró diferencia significativa entre las medias de las células en diferenciación temprana (wDBA+) de los grupos control ($51.25 \pm 25.49\%$) y las purificadas post percoll ($31.15 \pm 25.70\%$) de las 8 muestras, lo cual demostraría el enriquecimiento por las gradientes discontinuas de Percoll. Caso contrario, la media de las células diferenciadas (DBA-) del grupo post percoll ($5.21 \pm 9.45\%$) fue menor a la media de la población celular sin afinidad por el marcador DBA del grupo control ($9.77 \pm 7.57\%$); sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Gráfico 1). Los datos de cada muestra se presentan en el Anexo 6.

En la Figura 15 se evidencia una población enriquecida de SSC luego de emplearse las columnas de Percoll. El ploteo muestra la selección de células redondas (recuadro verde) que incluyen las SSC en mayor proporción en el grupo Post Percoll; y el histograma indica los porcentajes de los tres grupos poblacionales (sDBA+, wDBA+, DBA-), clasificadas según la intensidad de fluorescencia con afinidad al marcador DBA.

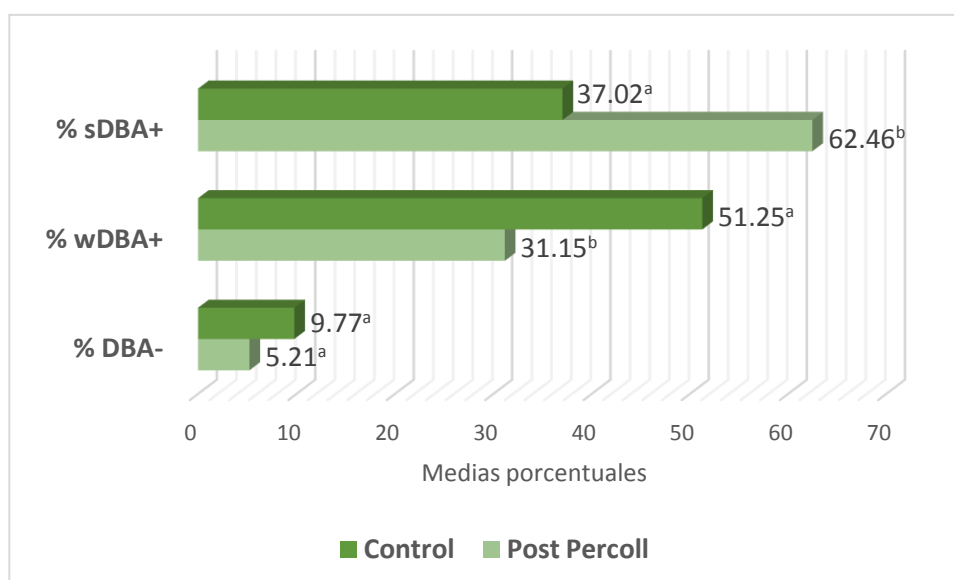
Tabla 7. Evaluación por Citometría de Flujo de la media porcentual de las poblaciones sDBA+, wDBA+ y DBA- (Grupo Control)

	<i>Media ± SD</i>	<i>Valor Mínimo</i>	<i>Valor Máximo</i>
sDBA+ (%)	37.02 ± 29.21	2.23	85.30
wDBA+ (%)	51.25 ± 25.49	12.50	83.14
DBA-	9.77 ± 7.57	2.20	24,19

Tabla 8. Evaluación por Citometría de Flujo de la media porcentual de las poblaciones sDBA+, wDBA+ y DBA- (Grupo Post Percoll)

	<i>Media ± SD</i>	<i>Valor Mínimo</i>	<i>Valor Máximo</i>
sDBA+ (%)	62.46 ± 33.15	3.64	95.91
wDBA+ (%)	31.15 ± 25.70	3.17	69.10
DBA-	5.21 ± 9.45	0.21	27.20

Gráfico 1. Comparación por tratamiento (Control y Post Percoll) de las medias porcentuales de las poblaciones sDBA+, wDBA+ y DBA- evaluadas por Citometría de Flujo



* Los superíndices distintos indican diferencias estadísticamente significativas. sDBA+: población de células madre espermatogoniales; wDBA+: células en vías de diferenciación; DBA-: células diferenciadas

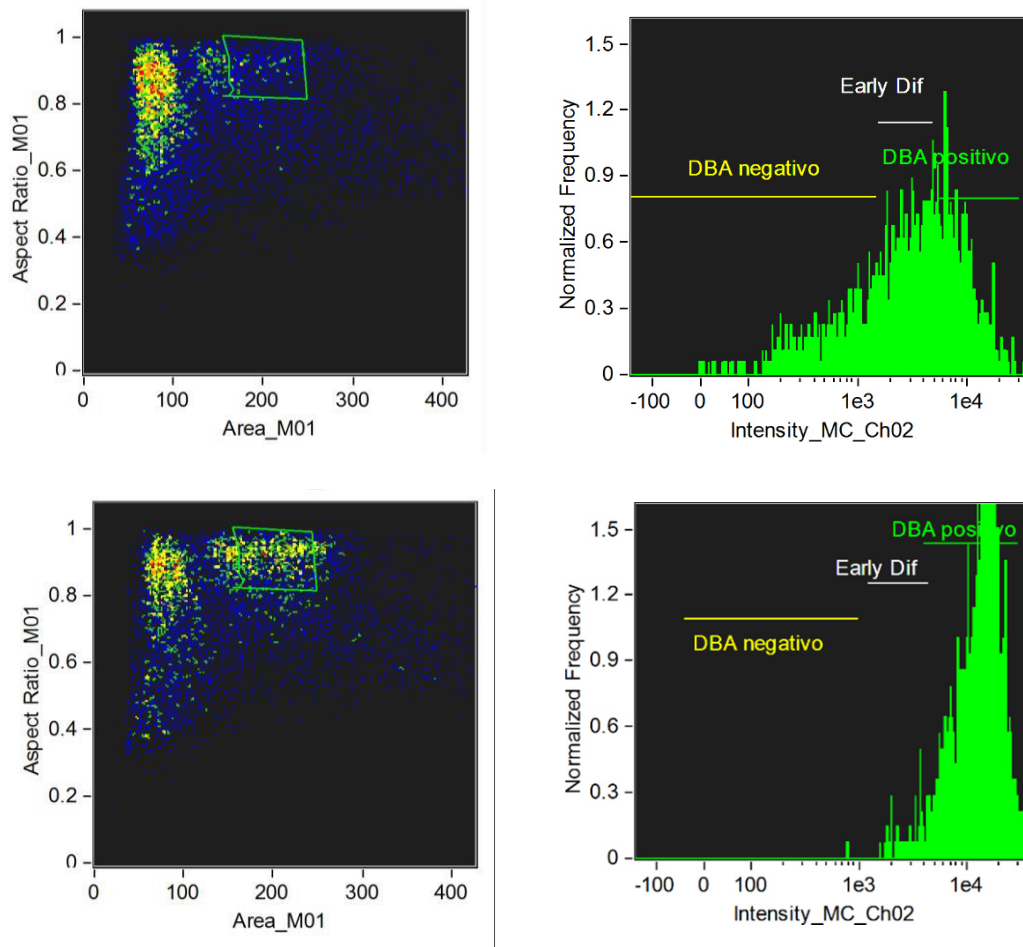


Figura 15. Comparación poblacional entre el grupo control (parte superior) y post percoll (parte inferior) evaluadas por citometría de flujo. Al lado izquierdo se observa el ploteo del total de células testiculares, con la selección de las células redondas dentro del recuadro verde (incluidas las SSC). En la columna de la derecha se observa el histograma con el análisis de las células seleccionadas y la clasificación de éstas en tres poblaciones (sDBA+, wDBA+, DBA-), según su fluorescencia.

7. Comparación de los porcentajes de SSC del Grupo Control y Post Percoll evaluados mediante Microscopía de fluorescencia

Se evaluaron ambos tratamientos (grupo control y post percoll) de 12 muestras mediante microscopía de fluorescencia. La media de los porcentajes de las células madre espermato goniales purificadas mediante las gradientes de Percoll (sDBA+) fue $30.85 \pm 21.98\%$, alcanzando un valor máximo de 81.82% (Tabla 10); mientras que la media del grupo control fue $13.33 \pm 18.88\%$. La diferencia entre ambas medias fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$), evaluación dada mediante la prueba Wilcoxon

para dos muestras relacionadas. Respecto a las células en vías de diferenciación (wDBA+) no se obtuvo diferencia significativa entre las medias del grupo control y post percoll ($9.90 \pm 14.81\%$, $7.05 \pm 6.71\%$, respectivamente); sin embargo, la comparación de las medias de las células diferenciadas (DBA-) sí presentó diferencia estadísticamente significativa (Gráfico 2, Anexo 7), mostrando para todos los grupos un rango muy amplio de datos (Anexo 7).

En la Figura 16 se observa el total de las células testiculares en campo claro, y la fluorescencia de aquellas que presentan afinidad con el marcador de células madre (sDBA+, wDBA+) en el campo fluorescente.

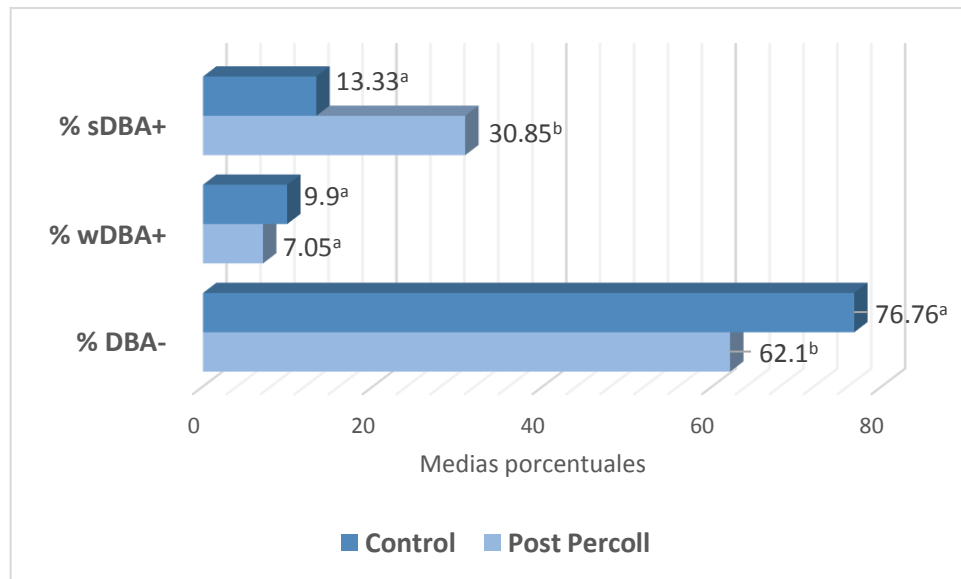
Tabla 9. Evaluación por Microscopía de Fluorescencia de la media porcentual de las poblaciones sDBA+, wDBA+ y DBA- (Grupo Control)

	<i>Media \pm SD</i>	<i>Valor Mínimo</i>	<i>Valor Máximo</i>
sDBA+ (%)	13.33 \pm 18.88	1.68	54.39
wDBA+ (%)	9.90 \pm 14.81	0.68	42.98
DBA-	76.76 \pm 33.63	2.63	96.94

Tabla 10. Evaluación por Microscopía de Fluorescencia de la media porcentual de las poblaciones sDBA+, wDBA+ y DBA- (Grupo Post Percoll)

	<i>Media \pm SD</i>	<i>Valor Mínimo</i>	<i>Valor Máximo</i>
sDBA+ (%)	30.85 \pm 21.98	12.24	81.82
wDBA+ (%)	7.05 \pm 6.71	1.16	23.68
DBA-	62.10 \pm 27.30	3.03	83.12

Gráfico 2. Comparación por tratamiento (Control y Post Percoll) de las medias porcentuales de las poblaciones sDBA+, wDBA+ y DBA- evaluadas por Microscopía de Fluorescencia



* Los superíndices distintos indican diferencias estadísticamente significativas. sDBA+: población de células madre espermatogoniales; wDBA+: células en vías de diferenciación; DBA-: células diferenciadas

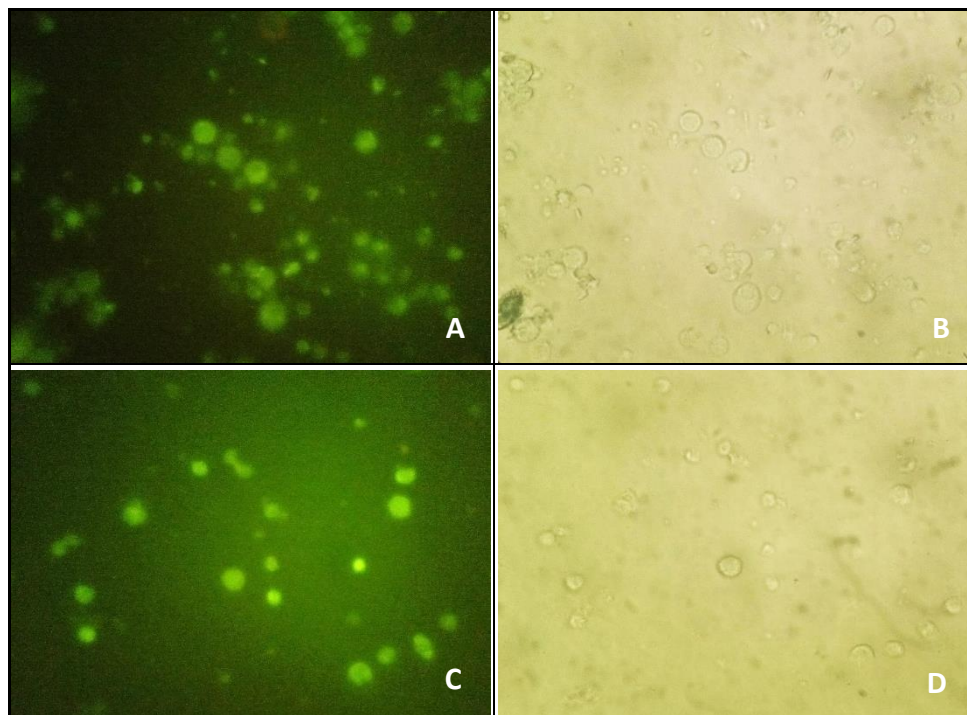


Figura 16. Comparación de las poblaciones control (A y B) y post percoll (C y D) evaluadas por microscopía de fluorescencia. A la izquierda se observa el campo fluorescente con las células marcadas según su afinidad con DBA; y a la derecha, el campo claro con el total de células testiculares.

8. Comparación porcentual de las SSC de los Cultivos Grupo Control y Post Percoll evaluados mediante Citometría de Flujo

Los cultivos de 8 días de los grupos Control y Post Percoll fueron evaluados mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. La evaluación por la primera técnica mencionada muestra que la media de las células madre espermato goniales (sDBA+) del grupo Cultivo Control 8d fue de $44.80 \pm 19.62\%$ frente al $37.02 \pm 29.21\%$ del grupo Control sin cultivar. La diferencia entre ambos valores no muestra diferencia significativa, al igual que la comparación de medias de las células sDBA+ del grupo Cultivo Control 8d y el grupo Cultivo Post Percoll 8d ($44.80 \pm 19.62\%$ vs $53.16 \pm 14.49\%$) (Gráfico 3). En resumen, la comparación de las medias de las tres diferentes poblaciones celulares (sDBA+, wDBA+, DBA-) entre los grupos Cultivo no muestran diferencia estadísticamente significativa entre sí, al igual que con sus respectivos grupos iniciales sin cultivar. Los análisis comparativos se realizaron usando la prueba T para dos muestras relacionadas y los datos muestrales se presentan en el Anexo 8.

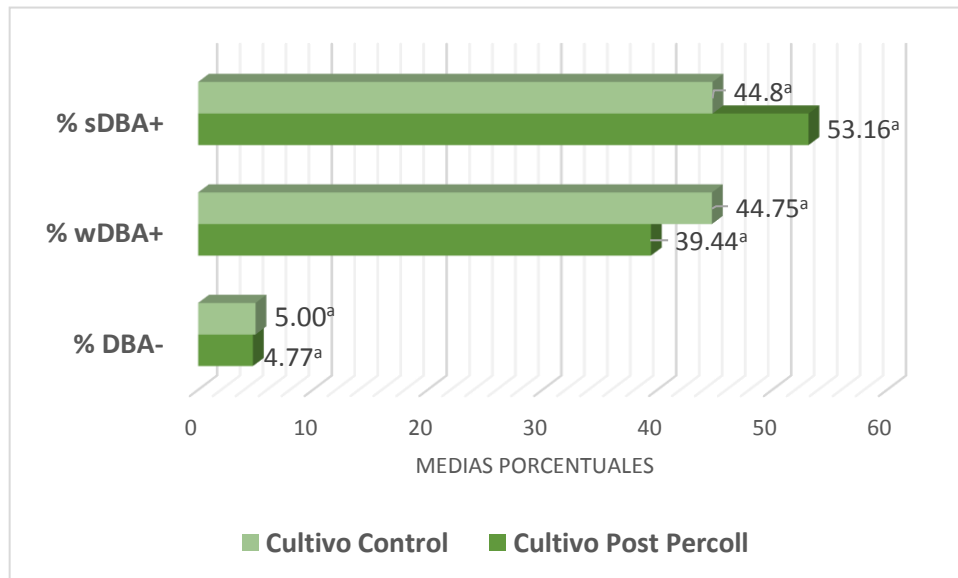
Tabla 11. Evaluación por Citometría de Flujo de la media porcentual de las poblaciones sDBA+, wDBA+ y DBA- (Grupo Cultivo Control 8d)

	<i>Media \pm SD</i>	<i>Valor Mínimo</i>	<i>Valor Máximo</i>
sDBA+ (%)	44.80 ± 19.63	20.20	84.60
wDBA+ (%)	44.75 ± 17.22	12.80	65.80
DBA-	5.00 ± 4.39	0.09	14.00

Tabla 12. Evaluación por Citometría de Flujo de la media porcentual de las poblaciones sDBA+, wDBA+ y DBA- (Grupo Cultivo Post Percoll 8d)

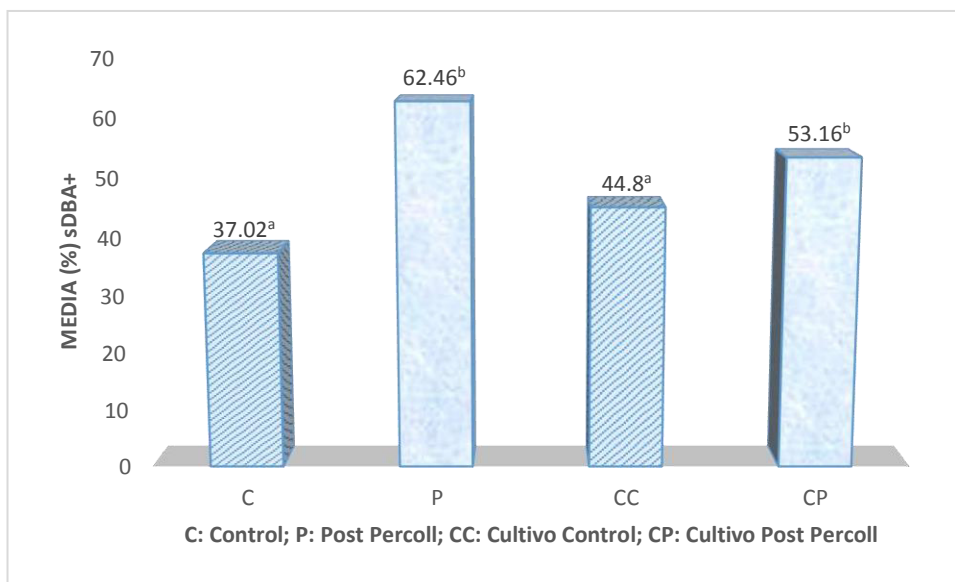
	<i>Media \pm SD</i>	<i>Valor Mínimo</i>	<i>Valor Máximo</i>
sDBA+ (%)	53.16 ± 14.49	34.10	81.20
wDBA+ (%)	39.44 ± 12.15	16.70	54.50
DBA-	4.77 ± 3.99	0.37	12.90

Gráfico 3. Comparación por tratamiento (Cultivo Control 8d y Cultivo Post Percoll 8d) de las medias porcentuales de las poblaciones sDBA+, wDBA+ y DBA- evaluadas por Citometría de Flujo



* Los superíndices iguales indican que no existe diferencias estadísticamente significativas. sDBA+: población de células madre espermatogoniales; wDBA+: células en vías de diferenciación; DBA-: células diferenciadas

Gráfico 4. Comparación de las medias porcentuales de células sDBA+ por tratamiento (Control - Percoll - Cultivo Control 8d - Cultivo Post Percoll 8d) evaluadas por Citometría de Flujo



* La comparación de las medias de la población sDBA+ de los grupos Control y Post Percoll con sus respectivos cultivos indica que no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí

9. Comparación porcentual de las SSC de los Cultivos Grupo Control y Post Percoll evaluados mediante Microscopía de Fluorescencia

La media de las células con fluorescencia más intensa (sDBA+) del cultivo de 8 días del grupo post percoll ($60.46 \pm 7.31\%$) fue mayor en comparación a la media del cultivo control ($50.36 \pm 8.07\%$). Este incremento mostró una diferencia significativa al igual que la comparación de las medias del grupo de células sin afinidad al DBA (DBA-); en cambio los valores de las medias porcentuales del grupo de células en diferenciación temprana (wDBA+) de ambos grupos cultivo fueron similares ($34.35 \pm 9.01\%$ vs $31.52 \pm 7.27\%$), sin encontrarse diferencia estadísticamente significativa (Gráfico 5, Anexo 9).

El Gráfico 6 muestra barras comparativas de las medias de la población sDBA+ de cada grupo de evaluación (Control, Post Percoll, Control Cultivo 8d y Post Percoll Cultivo 8d).

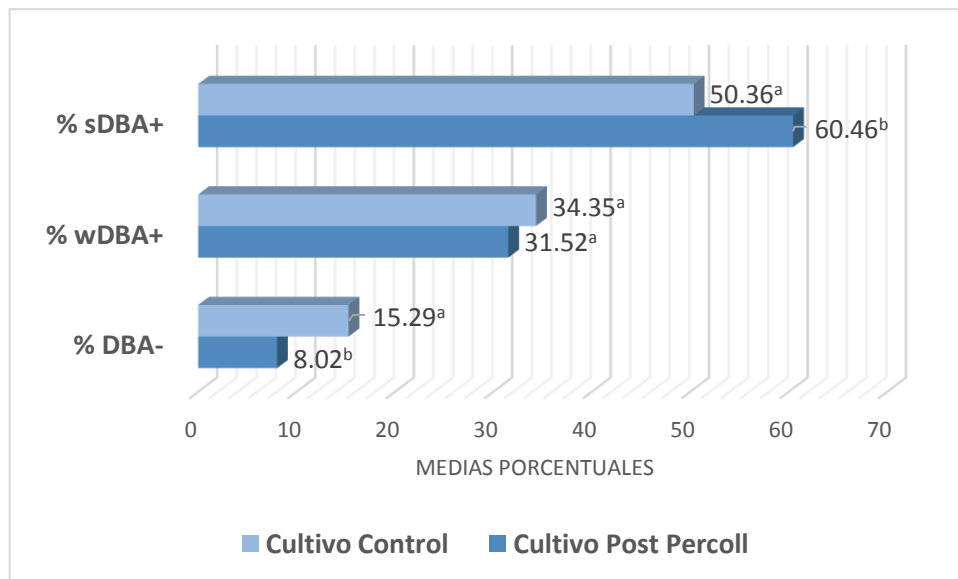
Tabla 13. Evaluación por Microscopía de Fluorescencia de la media porcentual de las poblaciones sDBA+, wDBA+ y DBA- (Grupo Cultivo Control 8d)

	<i>Media \pm SD</i>	<i>Valor Mínimo</i>	<i>Valor Máximo</i>
sDBA+ (%)	50.36 \pm 8.07	37.35	65.00
wDBA+ (%)	34.35 \pm 9.01	18.88	46.55
DBA-	15.29 \pm 13.20	3.45	41.11

Tabla 14. Evaluación por Microscopía de Fluorescencia de la media porcentual de las poblaciones sDBA+, wDBA+ y DBA- (Grupo Cultivo Post Percoll 8d)

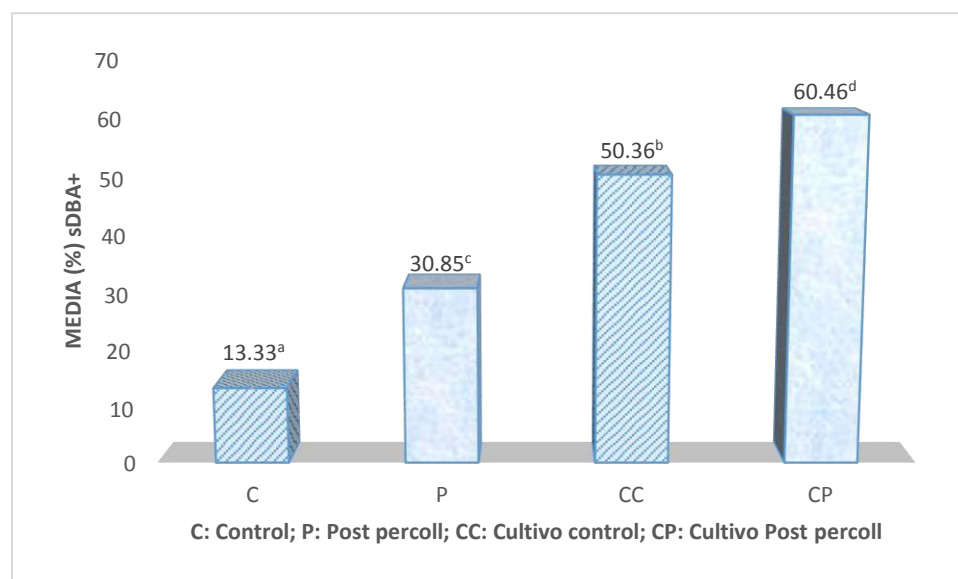
	<i>Media \pm SD</i>	<i>Valor Mínimo</i>	<i>Valor Máximo</i>
sDBA+ (%)	60.46 \pm 7.31	49.15	72.94
wDBA+ (%)	31.52 \pm 7.27	17.65	43.95
DBA-	8.02 \pm 5.45	3.43	20.10

Gráfico 5. Comparación por tratamiento (Cultivo Control 8d y Cultivo Post Percoll 8d) de las medias porcentuales de las poblaciones sDBA+, wDBA+ y DBA- evaluadas por Microscopía de Fluorescencia



* Los superíndices distintos indican que existe diferencias estadísticamente significativas. sDBA+: población de células madre espermatogoniales; wDBA+: células en vías de diferenciación; DBA-: células diferenciadas

Gráfico 6. Comparación de las medias porcentuales de células sDBA+ por tratamiento (Control - Percoll - Cultivo Control 8d - Cultivo Post Percoll 8d) evaluadas por Microscopía de Fluorescencia



* La comparación de las medias de la población sDBA+ de los grupos Control y Post Percoll con sus respectivos cultivos indica que sí presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí

10. Comparación de Cultivos Control y Post Percoll

Los cultivos controles producto del aislamiento enzimático evidenciaron la presencia de gran cantidad de detritos o contaminantes, además de glóbulos rojos (la cantidad dependió de las muestras). Por el contrario, los cultivos post percoll se observaron más limpios, con presencia mayoritaria de células madre espermato goniales y gran reducción de otras células testiculares como espermatozoides, células somáticas o glóbulos rojos.

Inicialmente los cultivos muestran a las células individualmente, luego de aproximadamente 4 días se logra ver la formación de colonias, las cuales aumentan hasta los días 7-8 y gradualmente van disminuyendo en número a medida que el cultivo se hace más largo. Además, se observó que la membrana de muchas células redondas del cultivo control se rompían en el transcurso del cultivo; sin embargo, las células del cultivo post percoll mantenían su morfología por más tiempo (Figura 17).

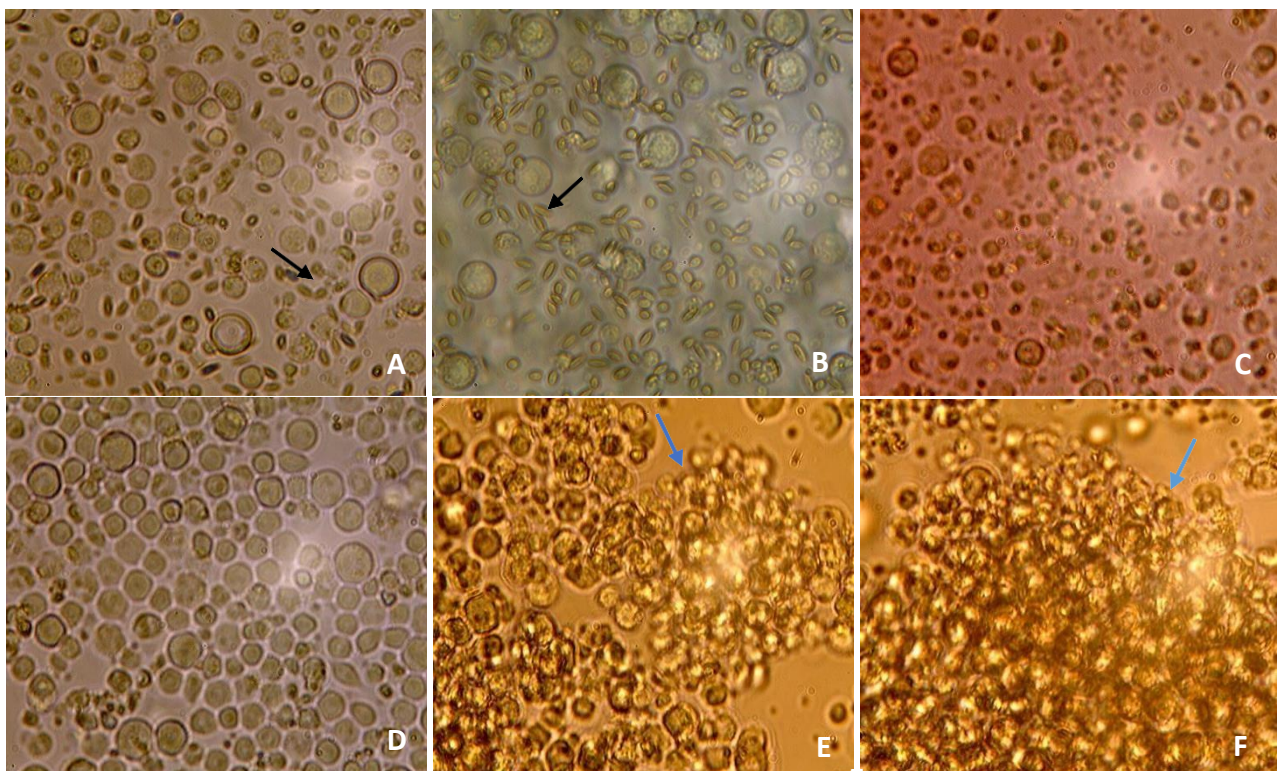


Figura 17. Cultivos control y post percoll en medio DMEM. (A-C) Vistas a 25X de los cultivos controles de 1, 4 y 8 días respectivamente. Se observa presencia de gran cantidad de glóbulos rojos (flechas negras) y detritus. (D-F) Vistas a 25X de los cultivos post percoll de 1, 4 y 8 días respectivamente. Se observan cultivos más limpios, con evidente reducción de glóbulos rojos u otros contaminantes, con formación de colonias celulares (flechas azules).

11. Caracterización de los cultivos *in vitro* de células de Sertoli

Las células cultivadas en las placas recubiertas con la lectina DSA y en medio DMEM + 10%SBF fueron vistos con microscopio invertido, con y sin contraste de fase. Inicialmente, presentaron forma casi redonda y se veían adheridas al fondo de los pocillos; en los días siguientes (dependiendo de cada muestra, al tercer o séptimo día) fueron tomando su forma aplanada con producción de extensiones, llegando a adquirir una apariencia epitelioide (Figura 18). Luego de 1-3 semanas de cultivo, se logró una confluencia aproximada del 90%, momento el cual se realizó el cambio de medio para el co-cultivo con las SSC post percoll.

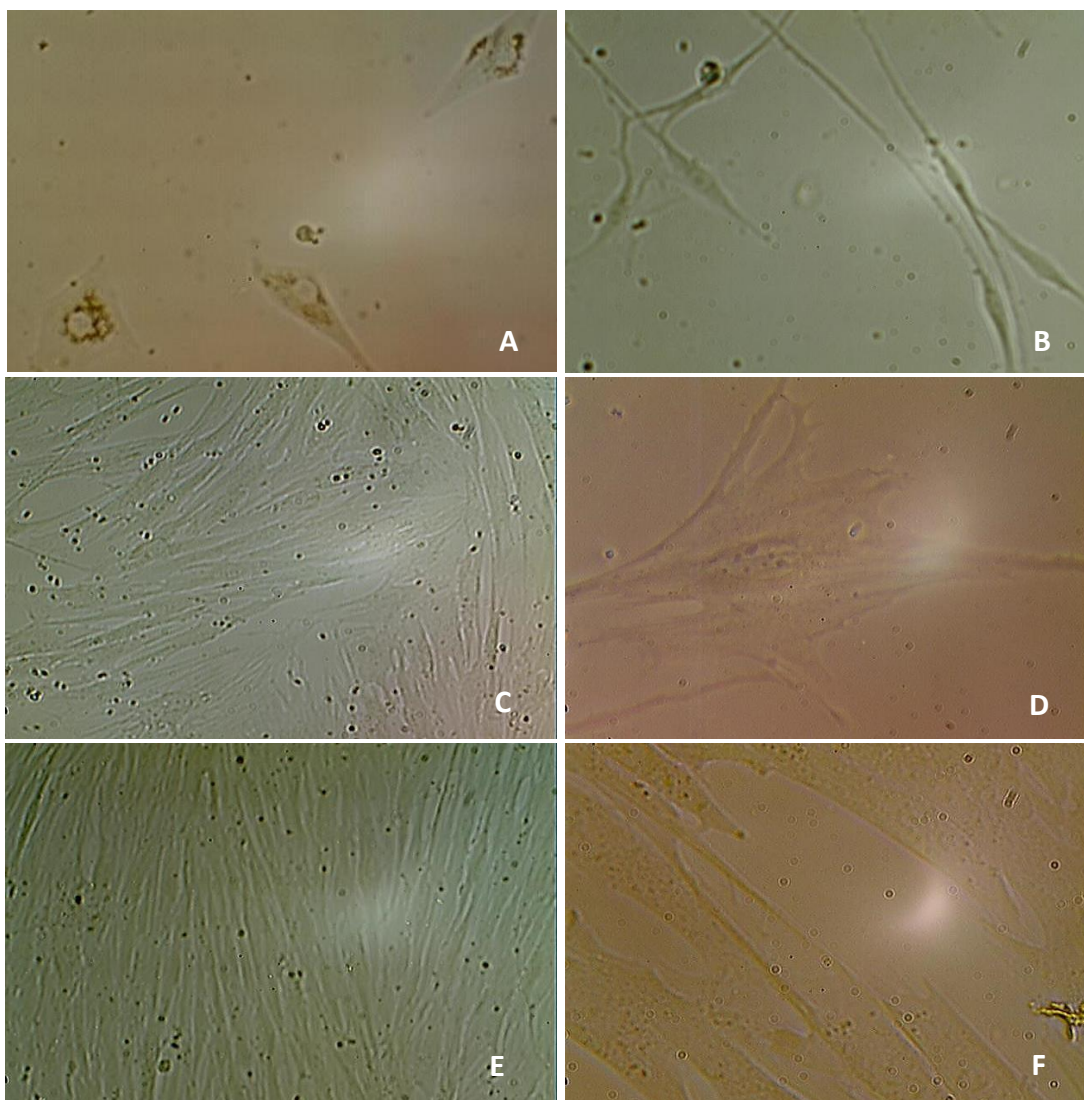
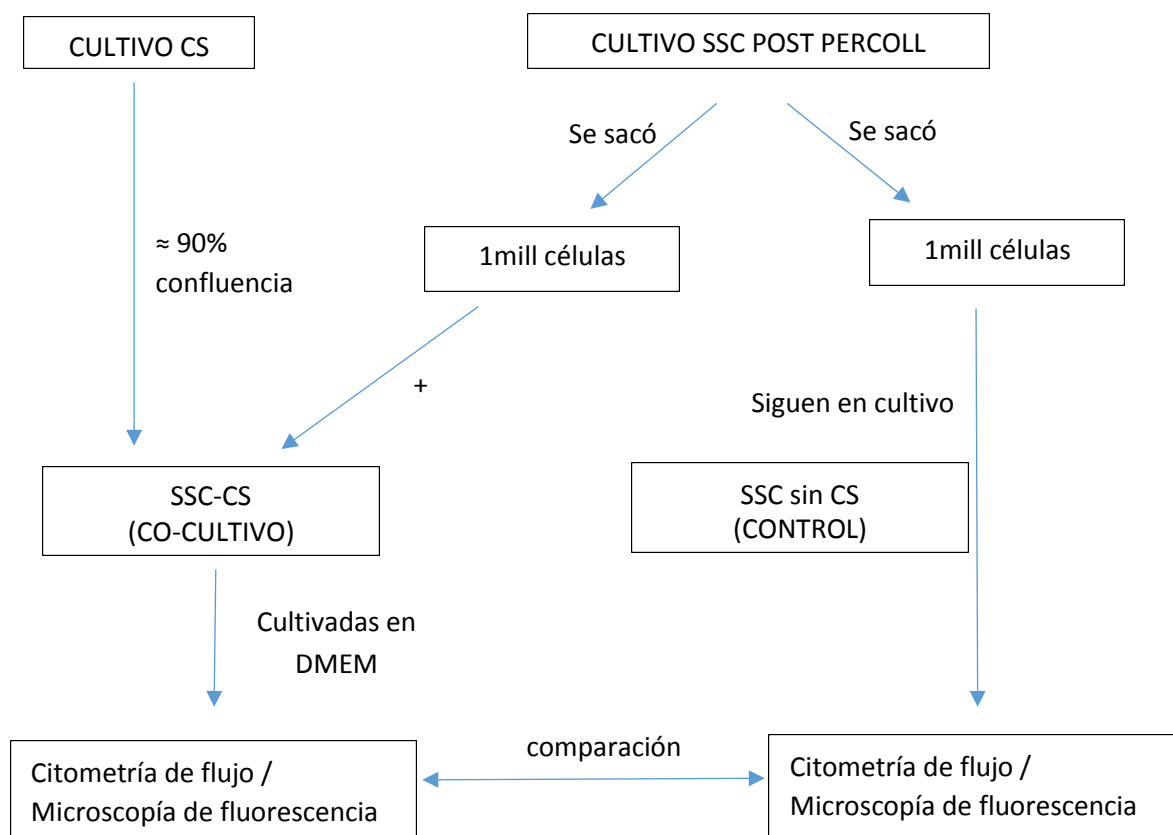


Figura 18. Caracterización de cultivos de células de Sertoli (CS) en medio DMEM + 10%SBF. (A) Vista a 25X de CS de 2 días de cultivo. (B) Vista a 25X de 5 días de cultivo, donde se aprecian células individuales con finas extensiones. (C) Vista a 10X del cultivo de 8 días, con grandes extensiones y contacto entre sí. (D) Vista a 25X con contraste de fase de células de 8 días de cultivo, donde se observa un núcleo con apariencia granular y contorno irregular. (E-F) Monocapa de CS luego de 2 y 3 semanas de cultivo, respectivamente.

12. Co-cultivos de células de Sertoli con SSC purificadas por las gradientes de Percoll

Los cultivos de las células de Sertoli en medio DMEM + 10%SBF que progresaron, tomaron entre 9-24 días en alcanzar el 90% de confluencia. Tras ello, se les agregó 1×10^6 de las células purificadas por las gradientes de Percoll que estaban en cultivo y se dejaron en co-cultivo durante 8-16 días en medio DMEM. Debido al tiempo requerido para el crecimiento de las células de Sertoli, se realizaron co-cultivos con SSC y células de Sertoli provenientes de diferentes muestras, empleando en algunas ocasiones SSC post percoll frescas (Tabla 15). Además, el grupo control estuvo comprendido por 1×10^6 de SSC post percoll (sin células de Sertoli) que siguió en crecimiento paralelamente con el co-cultivo.

Se muestra el flujograma:



* SSC: células madre espermatogoniales post percoll; CS: células de Sertoli

Los co-cultivos en medio DMEM fueron vistos en microscopio invertido con y sin contraste de fase 25X, donde la proliferación de las SSC fue muy rápida los tres primeros días, observándose células muy redondas comparadas a su respectivo cultivo control (SSC post percoll sin células de Sertoli) y con formación de varias colonias de SSC, las cuales empezaron a aparecer desde el segundo día de co-cultivo y a disminuir en número luego de 8-10 días. La evaluación visual al microscopio registró la ruptura de las células del grupo control en promedio luego de 8-10 días de cultivo, y al cabo de dos semanas su número disminuyó aún más, dejando restos celulares en el medio. Aunque se observó una disminución del número celular en los co-cultivos, luego de aproximadamente dos semanas se observaron clonas de SSC, en íntimo contacto con las células de Sertoli (Figura 19H, Figura 20).

Tabla 15. Detalles de los 8 co-cultivos

CO-CULTIVOS		Días de cultivo antes del co-cultivo	Días de co-cultivo
5SSC-5CS	5SSC	10	16
	5CS	10	
20SSC-14CS	20SSC	3	10
	14CS	9	
22SSC-20CS	22SSC	9	8
	20CS	10	
30SSC-14CS	30SSC	9	13
	14CS	22	
45SSC-24CS	45SSC	0	8
	24CS	20	
52SSC-35CS	52SSC	0	8
	35CS	15	
57SSC-37CS	57SSC	0	8
	37CS	14	
52SSC-26CS	52SSC	3	8
	26CS	24	

* SSC: células madre espermatozoniales post percoll; CS: células de Sertoli

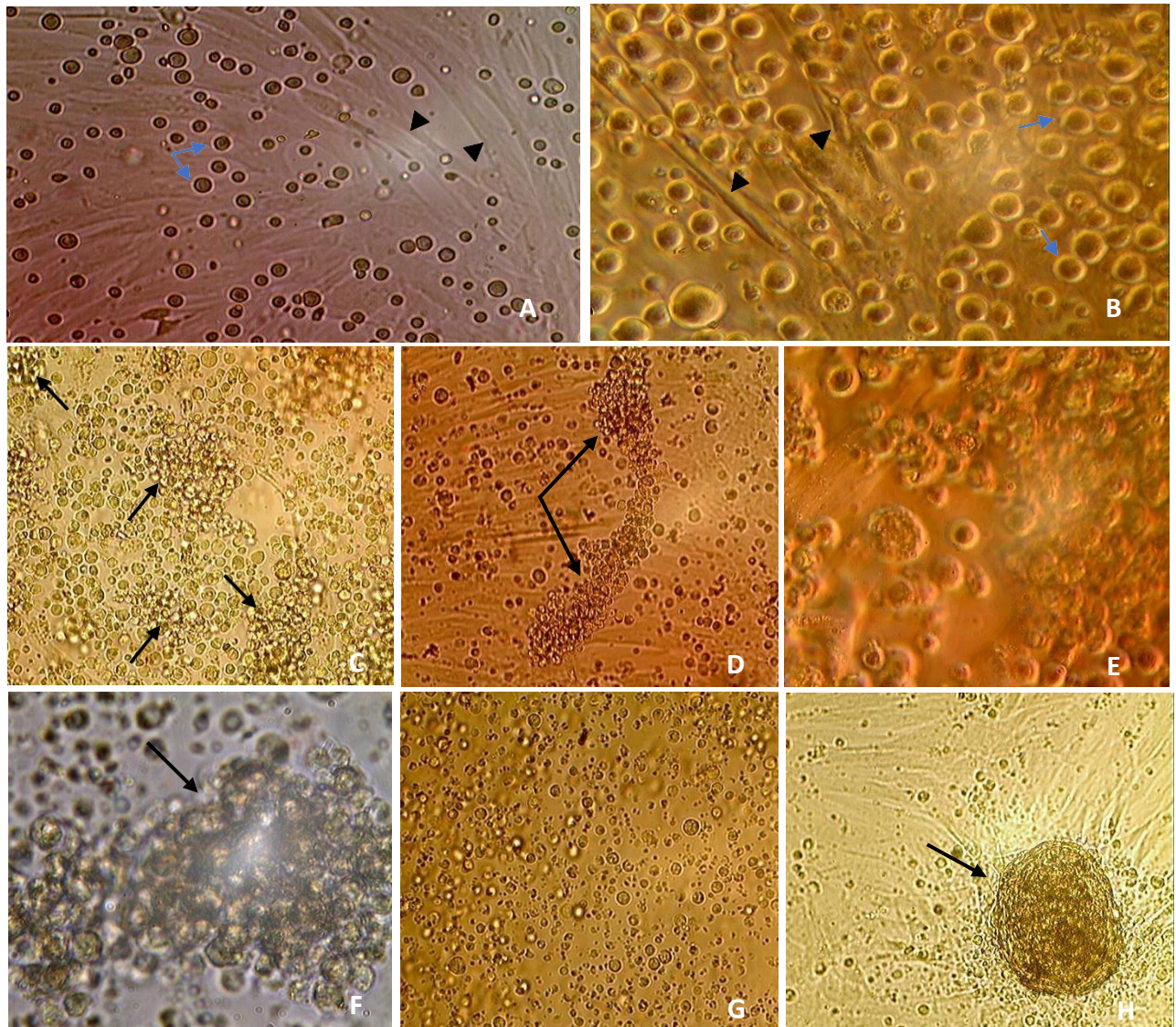


Figura 19. Co-cultivos (SSC post percoll-Sertoli) en medio DMEM. (A-B) Vista a 10X y en contraste fase 25X del primer día de co-cultivo. SSC (flechas azules) y células de Sertoli (cabeza de flecha negra). (C-D) Vistas a 10X de colonias de SSC en el tercer día de co-cultivo (flechas negras). (E) Día 4 visto en contraste de fase 25X. (F) Colonia de SSC en el día 8 del co-cultivo, visto a 25X. (G) Día 10 del co-cultivo, visto a 10X. (H) Vista a 10X de una clona de SSC en el día 13 del co-cultivo.

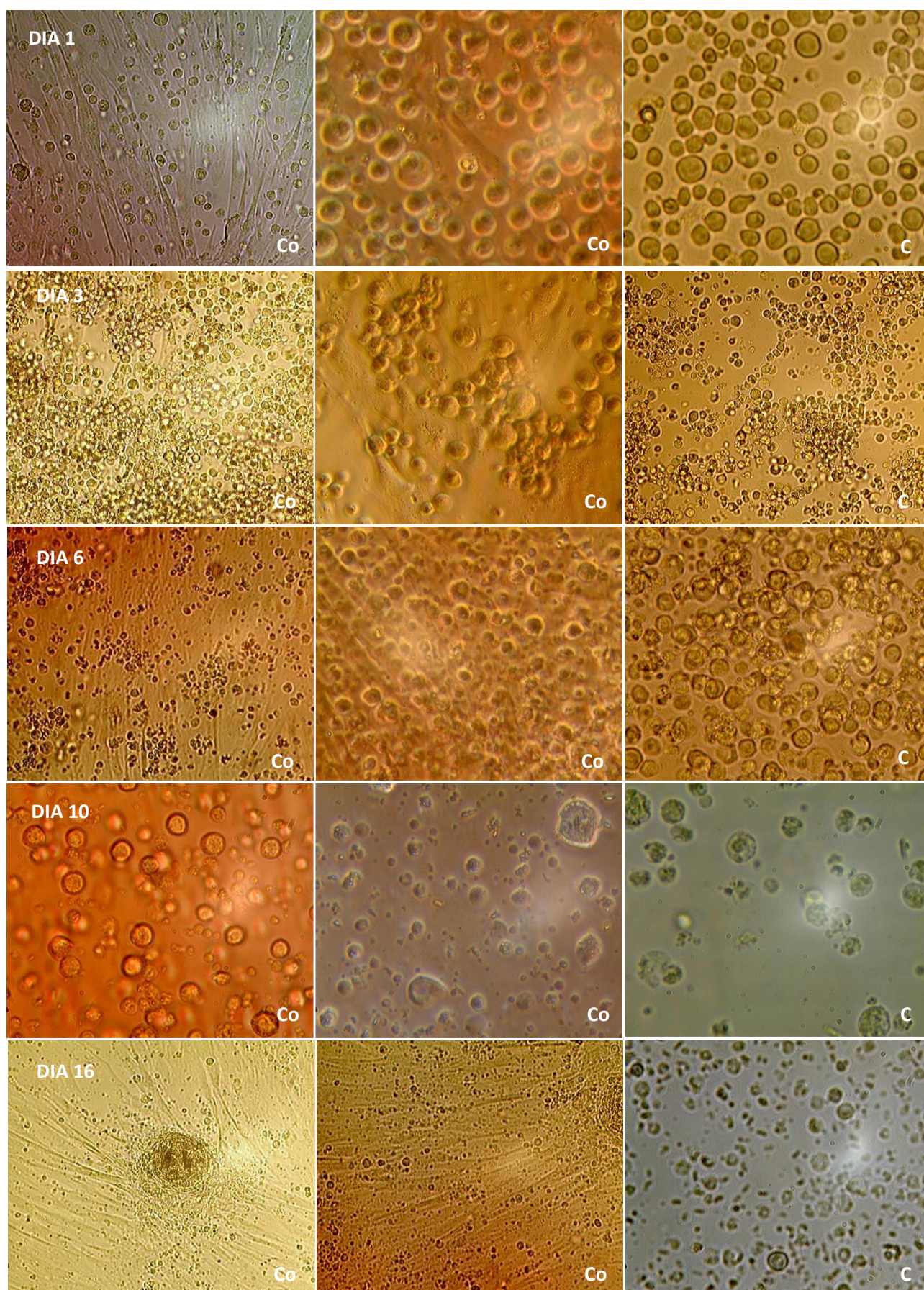


Figura 20. Comparación de los co-cultivos (SSC post percoll-Sertoli) con sus controles (SSC post percoll sin Sertoli) en 16 días de cultivo. Co: co-cultivos; C: cultivos control

Se evaluó el porcentaje de cada uno de los tres grupos poblacionales (sDBA+, wDBA+, DBA-), discriminados mediante microscopía de fluorescencia, haciendo comparaciones entre los co-cultivos y sus respectivos cultivos control.

Tabla 16. Porcentajes de células sDBA+, wDBA+, DBA- en 8 co-cultivos y sus respectivos cultivos control – Microscopía de Fluorescencia

		% sDBA+	% wDBA+	% DBA-
Par 1	5SSC 26D (control)	18.18	45.45	36.36
	5SSC-5CS 16D (co-cultivo)	32.35	26.47	41.18
Par 2	20SSC 13D (control)	38.38	24.24	37.37
	20SSC-14CS 10D (co-cultivo)	29.53	27.73	42.74
Par 3	22SSC 17D (control)	24.75	29.7	45.54
	22SSC-20CS 8D (co-cultivo)	38.18	16.36	45.45
Par 4	30SSC 22D (control)	51.92	19.23	28.85
	30SSC-14CS 13D (co-cultivo)	46.67	32.00	21.33
Par 5	45SSC 8D (control)	18.28	37.63	44.09
	45SSC-24CS 8D (co-cultivo)	37.98	27.91	34.11
Par 6	52SSC 8D (control)	52.24	41.79	5.97
	52SSC-35CS 8D (co-cultivo)	54.92	38.52	6.56
Par 7	57SSC 8D (control)	56.00	32.00	12.00
	57SSC-37CS 8D (co-cultivo)	66.67	25.93	7.41
Par 8	52SSSC 11D (control)	65.91	20.45	13.64
	52SSSC-26CS 8D (co-cultivo)	78.65	8.99	12.36

Gráfico 7. Comparación porcentual de las células sDBA+ de los co-cultivos y sus controles- evaluación por Microscopía de Fluorescencia

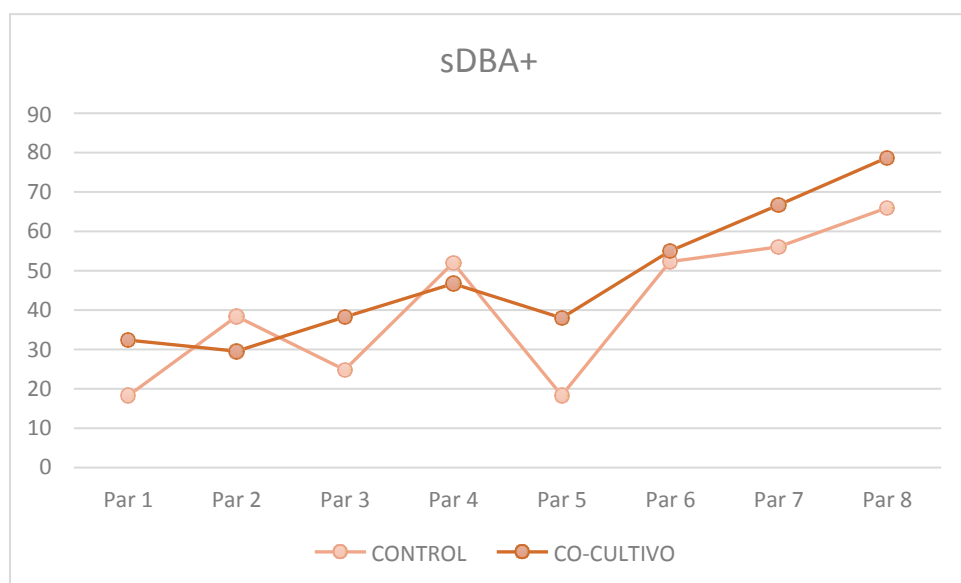
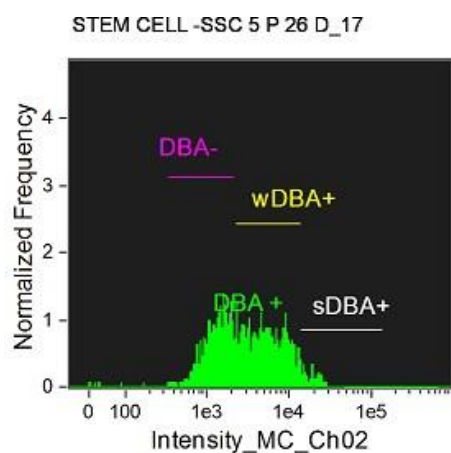


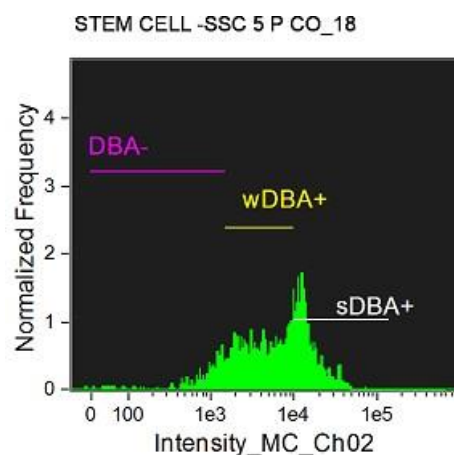
Tabla 17. Porcentajes de células sDBA+, wDBA+, DBA- en un co-cultivo y su respectivo cultivo control – Citometría de Flujo

		% sDBA+	% wDBA+	% DBA-
Par 1	5SSC 26D (control)	4.34	55.6	38.1
	5SSC-5CS 16D (co-cultivo)	35.0	52.7	11.5



Intensity_MC_Ch02

Population	Count	%Gated
STEM CELL & focus	1728	100
sDBA+ & STEM CELL & focus	75	4.34
wDBA+ & STEM CELL & focus	961	55.6
DBA- & STEM CELL & focus	659	38.1



Intensity_MC_Ch02

Population	Count	%Gated
STEM CELL & focus	2272	100
sDBA+ & STEM CELL & focus	796	35
wDBA+ & STEM CELL & focus	1198	52.7
DBA- & STEM CELL & focus	261	11.5

Figura 21. Histogramas del Par 1 (control y co-cultivo). Se comparan los porcentajes de las poblaciones sDBA+, wDBA+, DBA- de cada grupo.

DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación tuvo por objetivo determinar herramientas biotecnológicas basadas en técnicas de purificación y cultivo celular *in vitro* de células madre espermatogoniales (SSC) y células de su nicho como las de Sertoli, que puedan ser útiles en el manejo reproductivo de las alpacas macho, partiendo del conocimiento funcional de éstas. Si bien este tema ha sido y sigue siendo bastante estudiado en especies como el ratón, ratas, porcinos, canes, chivos, bovinos y hasta humanos (Kon *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2008; Von Kopylow *et al.*, 2010), aún se desconoce en su totalidad los mecanismos moleculares que regulan la espermatogénesis, particularmente en los camélidos. Sin embargo, es indiscutible la existencia de diversas interacciones entre los distintos tipos de células testiculares.

Para desarrollar alternativas que ayuden a superar las barreras reproductivas de animales como las alpacas es importante el conocimiento de técnicas de aislamiento y purificación celular, partiendo de la comprensión de los procesos bioquímicos que implica una ruptura de tejido, con el fin de separarlas en sus diferentes tipos celulares y poder obtener una población relativamente homogénea con alto grado de pureza. Este paso es fundamental dado que en este trabajo se busca aislar de manera eficiente a las células madre espermatogoniales, aquellas con capacidad de restablecer la espermatogénesis; y a las células de Sertoli, importantes por ser aquellas que sirven de soporte para el normal desarrollo de este proceso.

Se ha descrito en ratones, ratas y chivos que los procesos de purificación de las SSC soportados por las células de Sertoli aumenta las probabilidades de éxito de restablecer la capacidad de producción de espermatozoides en individuos infértiles, cuya producción espermática presentaría el genotipo de la especie donadora y por lo cual esta herramienta ayudaría a diseminar las características genéticas superiores o producir animales transgénicos (Herrid *et al.*, 2007). En este aspecto, uno de los objetivos a largo plazo es lograr establecer una línea germinal de células madre

espermatozonales de alpaca que pueda ser empleada para futuros alotrasplantes y lograr superar las barreras reproductivas que las caracteriza. Para ello se busca aislar y propagar *in vitro* las SSC de individuos jóvenes y adultos, así como purificar y enriquecer la baja población de éstas.

Sumado a este objetivo, estudios similares con diversas especies afirman que la edad y el estado funcional de los animales son puntos clave para lograr una óptima recuperación de células madre espermatozonales y el desarrollo continuo del cultivo *in vitro*, ya que estos factores afectan tanto el rendimiento como la pureza de las fracciones celulares separadas, y es por ello que la mayoría de investigaciones similares emplean organismos inmaduros o prepúberes con el objetivo de disminuir la contaminación dada por la variedad de estados de diferenciación de las células de la línea germinal (Koruji *et al.*, 2009); sin embargo, en este estudio se emplearon muestras testiculares de alpacas macho adultos destinados al consumo humano, es decir, aquellos con una gran variedad de células testiculares, además de presentar evidentes problemas reproductivos. A pesar de ello, los resultados muestran aislamientos exitosos de SSC, la purificación de éstas mediante las gradientes de Percoll, y aislamientos de células de Sertoli, haciendo viable los cultivos *in vitro*. De esta manera, la separación de las SSC del resto de las células testiculares se basó en el conocimiento de las propiedades físicas como la densidad celular, optando por el uso de gradiente de densidad acompañado de procesos de centrifugación. Así también, se aprovechó la capacidad de adherencia de las células de Sertoli a soportes de plástico, empleando la lectina DSA con el cual el proceso de aislamiento sea más rápido, eficaz y se obtenga una población con una alta pureza.

Inicialmente se analizaron los parámetros espermáticos, principalmente la movilidad y concentración, con el fin de servir de guía y predecir indirectamente las muestras con mejor actividad proliferativa en cultivo. Dado que se tuvo la certeza de trabajar solo con muestras de alpacas adultas (aproximadamente entre 2 a 3 años), los testículos más pequeños se descartaron ya que podría tratarse de casos de hipogonadismo o atrofia

testicular, descritos en necropsias de machos sacrificados en camales (Sumar, 1983). También fueron descartados aquellos pares de testículos que físicamente presentaban edemas, quistes, pus o coloración rojo intenso, siendo esta última característica no excluyente ya que la presencia de glóbulos rojos se eliminaría con el uso del Percoll; sin embargo, una excesiva cantidad de éstas dificultaría el proceso. Tomando en cuenta dichos puntos, el número de muestras empleadas para este estudio y que llegaron a proliferar en cultivo fue mucho menor al total de gónadas enviadas provenientes del camal de Huancavelica.

Para el aislamiento de las SSC se optó por digestiones enzimáticas, empleando colagenasa, enzima que actúa rompiendo el colágeno, principal componente de la matriz extracelular; hialuronidasa que actúa sobre la matriz extracelular del tejido conectivo; y DNasa, la cual degrada el material genético expuesto en el medio, producto del daño mecánico de algunas células (Izadyar *et al.*, 2002). Este procedimiento permite la disrupción de la matriz extracelular, reduciendo el tejido a una suspensión de células testiculares individuales, donde es importante tomar en cuenta la duración de cada proceso enzimático y la concentración de las enzimas para disminuir a lo mínimo posible el daño a las SSC y así poder preservar la información genética de éstas. Se siguió el protocolo de aislamiento de células madre de alpaca, implementado en el laboratorio (Reyes, 2018) con ligeras modificaciones como las revoluciones y tiempos de centrifugación, reduciendo la velocidad de 4000 rpm a 1500 rpm ya que resultaría en un menor daño en las células, y realizándose dos lavados de 5 minutos cada uno luego de la segunda digestión enzimática, con la finalidad de reducir los contaminantes y quitar con mayor eficacia el exceso de las enzimas empleadas. Siguiendo dichos lineamientos, luego de las digestiones enzimáticas se obtuvo una viabilidad media inicial de 92.59% y una concentración de células redondas entre las que se encontraría la población de SSC, de 71.26 mill/ml (Tabla 2) de un total de 2.4 g de tejido testicular por muestra, por lo que se tendría 29.69 mill/g de células. Estos resultados comparados a la viabilidad media de 70.74% y concentración de 15.9 mill/g obtenidos con el protocolo anterior

(Reyes, 2018) o con el rango de 75% - 90% de viabilidad de células testiculares de cuatro distintos grupos etarios de alpaca obtenidos en el trabajo de Huamaní (2018), reflejarían una mejora del procedimiento actual; y dado que el proceso de purificación de las SSC por las gradientes de Percoll implica una disminución en la cantidad de las células iniciales, se sugiere que la muestra de partida preferentemente tenga una concentración apreciable, acompañado de valores de viabilidad altos. Sin embargo, el valor promedio de concentración celular aquí obtenido sería mucho menor al producto de las digestiones enzimáticas de muestras testiculares de toro o porcino, donde se ha logrado alcanzar entre 60 - 80 millones de células redondas por gramo testicular (Herrid *et al.*, 2009). Por otro lado, el valor promedio de la viabilidad inicial registrado en este estudio (92.59%), es comparable a porcentajes mayores al 80% - 90% obtenido de digestiones enzimáticas de células testiculares de búfalo, ratas y humanos (Rafeeqi y Kaul, 2013), demostrando que la mayoría de las células mantienen la funcionalidad e integridad de su membrana plasmática. Estos valores indicarían la eficacia del proceso de aislamiento celular empleado, a pesar de las condiciones desfavorables como el tiempo de transporte de las muestras biológicas (24h post mortem) y la edad de los individuos, factores que influirían negativamente en el aislamiento de los diferentes tipos celulares, así como en el progreso de los cultivos *in vitro*.

Dado que uno de los objetivos a largo plazo es el establecimiento de una línea celular apta para alotrasplantes, es necesario enriquecer la escasa población de las SSC, lograr expandirlas y finalmente criopreservarlas. Es así como diversos estudios emplean una o la combinación de varias técnicas de enriquecimiento de SSC como el plaqueo diferencial, las gradientes de Percoll, la selección por matrices extracelulares o la combinación de éstas. En este sentido, se optó por el uso de las gradientes de Percoll dado que cuenta con resultados satisfactorios de acuerdo con la literatura revisada.

Según Heidari y su equipo de investigación, la baja viscosidad y osmolalidad del Percoll serían las características responsables de la óptima separación de los distintos tipos celulares de acuerdo a sus densidades (Heidari *et al.*, 2014). Este método sería ideal

para separar células cuyas densidades difieren en más de 0.02 g/ml; sin embargo, dado que las espermatogonias tipo A son de tamaño similar, cabe la posibilidad de separar no solamente las SSC (Zhang *et al.*, 2016). Por tanto, es necesario corroborar el éxito de dicho procedimiento mediante técnicas de identificación de células madre, como citometría de flujo, microscopía de fluorescencia, entre otras.

El Percoll empleado fue testeado para cultivo celular, es decir, fue el más adecuado con menor riesgo de causar efectos negativos en la viabilidad y morfología de las SSC. Esto se pudo corroborar mediante la comparación de las medias de las viabilidades inicial (producto de las digestiones enzimáticas) y post percoll ($92.59 \pm 6.92\%$ y 92.47 ± 5.79 , respectivamente), cuya diferencia no resultó ser estadísticamente significativa ($p > 0.05$). Además, se alcanzó un valor máximo de 81.50% de SSC recuperadas, producto de la relación de las células obtenidas del anillo y el total de células redondas cargadas inicialmente en la gradiente (Tabla 5). Esta población purificada y enriquecida de SSC vista al microscopio óptico constó de una población homogénea con bordes redondeados y una pequeña fracción de células de menor tamaño, las cuales podrían estar comenzando un proceso de diferenciación, según lo hipotetizan en un estudio similar con muestras testiculares de alpaca (Huamaní, 2018).

La identificación de las células madre espermatogoniales en cortes histológicos se puede lograr gracias al uso de marcadores como el DBA (*Dolichos biflorus agglutinin*), una lectina con afinidad específica a residuos de N-acetil- α -D-galactosamina (α -D-GalNAc) presentes en las SSC, caracterizándolas según el tamaño, forma del núcleo o la cantidad de nucleolos, lo cual probablemente sería indicativo del estado de diferenciación celular (Izadyar *et al.*, 2002). Por ejemplo, en testículos de bovino prepúberes se han encontrado tres grupos de espermatogonias de diferentes tamaños y número de nucleolos, donde el grupo de células de menor tamaño y con uno a tres nucleolos probablemente da referencia a las células más indiferenciadas, mientras que las de mayor tamaño y con un gran nucleolo central corresponderían a aquellas que han iniciado el proceso de diferenciación dado que presentan una fuerte reacción positiva a

c-Kit (Wrobel, 2000), en tanto que estudios como el del grupo de Valdivia y colegas ha demostrado que el marcador DBA reconoce subpoblaciones espermatogoniales según la intensidad de fluorescencia emitida (Valdivia *et al.*, 2019a). Entre ellas se encontrarían las SSC, caracterizadas por ser aquellas que se marcan más fuertemente con el conjugado DBA-FITC y nombradas como strong DBA+ (sDBA+) y las SSC en vías de diferenciación, con un marcaje más débil y nombradas como weak DBA+ (wDBA+). Siguiendo y corroborando lo ya planteado se evaluaron las diferentes poblaciones celulares en fresco y cultivadas, comparando lo obtenido con otros trabajos, sea en la misma o diferente especie animal.

Si bien no se tiene información sobre la relación numérica entre las células germinales y las células de Sertoli en la alpaca, sí existe registro de otras especies como el toro con una proporción aproximada del 10% de espermatogonias, 40% de células de Sertoli y 20% de otras células somáticas. Estos datos serían obtenidos luego de las digestiones enzimáticas del tejido testicular de individuos prepúberes y analizados mediante inmunocitoquímica, marcadores de superficie o según características funcionales y físicas (Herrid *et al.*, 2007). En cuanto a las poblaciones celulares de la rata, se encontró que las espermatogonias representan el 30% del total de las células testiculares con una cantidad aproximada de 27 millones de células de Sertoli por gramo testicular (França y col., 2005); y entre los resultados aquí obtenidos mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia registraron medias de las células con fuerte afinidad al DBA producto de las digestiones enzimáticas del $37.02 \pm 29.21\%$ (de ocho de las muestras trabajadas) y $13.33 \pm 18.88\%$ (de doce de las muestras), respectivamente (Tabla 7, Tabla 9), siendo una estimación que contribuiría con estudios posteriores del aspecto reproductivo de la alpaca. Ambas técnicas de identificación de SSC se basan en el uso de marcadores celulares acoplados a fluorocromos; sin embargo, presentan claras diferencias como la sensibilidad y rapidez de evaluación. La citometría de flujo se presenta como un método objetivo y mucho más rápido dado que analiza miles de células por segundo en tiempo real, siendo capaz de cuantificarlas y discriminarlas una

a una según la fluorescencia emitida; en cambio la evaluación por microscopía de fluorescencia va a depender del criterio del operador al agrupar las poblaciones celulares según la intensidad de fluorescencia, el tiempo requerido para el análisis es mayor, pero con la posibilidad de constatar visualmente el marcaje de las agrupaciones celulares.

Entre algunos de los trabajos expuestos como parte de la literatura, se ha dado a conocer que la evaluación del aislamiento de células testiculares de búfalos prepúberes de 10 - 14 meses registró un promedio de 27.58% de espermatogonias tipo A DBA+ del total de células testiculares producto de dos digestiones enzimáticas, con una viabilidad superior al 80%. A ello le seguiría el plaqueo diferencial con el cual la pureza celular obtenida fue de 48.27% y una viabilidad media de 78.40%; sin embargo, el subsecuente empleo de las gradientes de Percoll (fracciones de densidades 1.0654, 1.0542, 1.0513 y 1.0413 g/ml usando medio MEM como dilutor) aumentaría aún más la pureza hasta obtener una media de 71.86% y viabilidad de 70.26% de SSC (Rafeeqi y Kaul, 2013). Dichos resultados se obtuvieron mediante citometría de flujo para el cual fueron analizados 10000 eventos por muestra, usando al igual que en el presente trabajo, el conjugado DBA-FITC. Además, se determinó que estos valores son comparables a los obtenidos de la purificación de espermatogonias tipo A de testículos de ratón prepúber (Bellve *et al.*, 1977), ratas (Morena *et al.*, 1996) y cerdos (Dirami *et al.*, 1999). Entretanto, un trabajo reciente en el cual se emplearon testículos de bovino adulto registró que el porcentaje de células DBA+ antes del Percoll (densidades 60%, 40%, 20%) fue $15.31 \pm 2.87\%$ y después del Percoll $52.70 \pm 7.50\%$, con la colecta de la interfase formada entre las fracciones de 40% y 20% (Kitamura *et al.*, 2018). Estas evidencias muestran un notable aumento del porcentaje de células DBA+ producto de la purificación mediante gradientes de densidad Percoll, lo cual es comparable con los resultados obtenidos en esta investigación, también evaluados mediante citometría de flujo. Como ya se mencionó, el porcentaje de células DBA+ de la suspensión de células testiculares (control) de ocho muestras trabajadas, fue $37.02 \pm 29.21\%$, el cual se incrementó

significativamente a $62.46 \pm 33.15\%$ (Gráfico 1) luego de emplearse las gradientes de Percoll (densidades 40%, 30% y 20%), alcanzando un valor máximo de 95.91% (Tabla 8) en la evaluación de la interfase formada entre las fracciones 20% y 30%. Por otro lado, la evaluación mediante microscopía de fluorescencia de las poblaciones celulares de las doce muestras restantes dio una media de células sDBA+ del grupo control de $13.33 \pm 18.88\%$, mientras que para el grupo post percoll la media fue de $30.85 \pm 21.98\%$, cuya diferencia también resultó ser estadísticamente significativa (Gráfico 2). Ambos resultados demostrarían la eficiencia del empleo de las gradientes de Percoll como método de enriquecimiento de las células madre espermato goniales; una alternativa muy empleada en animales grandes.

Otros estudios aseveran que la eficiencia de purificación de las SSC varía con los diferentes métodos existentes (Kim *et al.*, 2013) y que la madurez de los testículos es un elemento importante en la recuperación de las espermato gonias (Borjigin *et al.*, 2010), lo cual se ve reflejado en el estudio de Ahmad y colegas, donde se alcanzó un 90% de pureza de espermato gonias tipo A de testículos prepúberes de búfalo (3-6 meses), combinando la selección con matrices extracelulares como laminina y gelatina, seguido de la separación por las gradientes de Percoll (Ahmad *et al.*, 2013). Otros métodos que también están siendo empleados son el FACS y MACS, cuyo uso se ha ido incrementando prevalentemente para el aislamiento y enriquecimiento de las espermato gonias de animales grandes; requieren el conocimiento del fenotipo de las espermato gonias y son sencillas de reproducir, aunque su costo es más elevado. Por ejemplo, MACS no requiere una gran cantidad de células iniciales y el enriquecimiento da una población celular con una alta viabilidad, lo cual es importante para los cultivos posteriores o la manipulación celular. Por esta razón, se debe analizar cuidadosamente la herramienta más adecuada para cada estudio, las combinaciones de los métodos y los requerimientos que implican. Sin embargo, se debe tener en cuenta que al hablar de enriquecimiento se hace referencia a las espermato gonias indiferenciadas, mas no exclusivamente a las SSC, por lo que es necesario seguir las investigaciones sobre

marcadores específicos de las SSC en las distintas especies de animales (Zheng *et al.*, 2014).

Una parte importante de las diferentes investigaciones sobre aislamiento de células madre espermatogoniales es la obtención de grandes cantidades de éstas, la posibilidad de propagarlas *in vitro* a partir de la baja cantidad existente en cada especie animal, valiéndose del uso de medios de cultivo altamente enriquecidos, condiciones específicas como la temperatura, pH, CO₂, suplementos nutritivos, factores de crecimiento, entre otros. Por ello, se realizaron cultivos de corto plazo que fueron evaluados al cabo de 8 días mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia, con el fin de conocer el comportamiento de las células en cultivo. A la actualidad hay muy poca información sobre cultivos de células testiculares de alpaca; sin embargo, el grupo de Valdivia y colegas ha obtenido con éxito cultivos de 14 y 21 días, dando a conocer las características de las SSC junto a las demás células de su nicho y en dos diferentes medios de cultivo, DMEM y StemPro (Valdivia *et al.*, 2019a), demostrando un notable aumento del número de las células sDBA+ en ambos medios. De manera similar, entre los resultados registrados mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia, se obtuvo una tendencia al aumento de las medias del número de las SSC cultivadas (sDBA+) respecto a sus controles iniciales, y una disminución de las células diferenciadas (DBA-), lo cual estaría acorde al estudio de la dinámica de crecimiento de las tres poblaciones celulares en cultivos primarios según Freshney (2010). Los valores obtenidos mediante el segundo método demuestran más claramente lo expuesto en el trabajo de Freshney, donde se hace alusión a un grupo de células en proliferación, correspondiente a las SSC (GC: 13.33% vs GCC: 50.36%; GPP: 30.85% vs GCP: 60.46%); otro grupo con la incapacidad de sobrevivir en cultivo dado que no pueden continuar con el ciclo espermatogénico, refiriéndose a las células diferenciadas o sin afinidad al DBA (GC: 76.76% vs GCC: 15.29%; GPP: 62.10% vs GCP: 8.02%); mientras que la última población celular estaría conformada por células con la capacidad de sobrevivir, mas no de proliferar en cultivo y que correspondería a las

células en vías de diferenciación (wDBA+). Sin embargo, las medias de los diferentes tratamientos de este último grupo poblacional no mostraron el comportamiento señalado, probablemente debido a una sobreestimación del número de células débilmente marcadas en los grupos cultivo y que debieron pertenecer al grupo de las SSC. Por el contrario, la evaluación de las otras ocho muestras por citometría de flujo sí demostró lo sostenido por Freshney (2010) y Valdivia (2019a).

En cuanto a la viabilidad de las SSC cultivadas, se evidenció una disminución en el tiempo respecto a sus valores iniciales (datos no mostrados), lo cual estaría relacionado a la liberación de restos celulares al medio de células distintas a las SSC que no progresarían en cultivo debido a las diferentes condiciones y necesidades nutritivas, además de la producción de especies reactivas de oxígeno como resultado del metabolismo del conjunto de células testiculares presentes en el cultivo y que podrían perjudicar los componentes celulares como el ADN, proteínas y lípidos de la membrana de las SSC (Aliakbari *et al.*, 2016). También se debe tener en cuenta que son más factibles los cultivos de corto plazo de SSC de animales domésticos, habiéndose logrado mantener la propagación de dichas células hasta por dos meses (Zhu *et al.*, 2013); sin embargo, sí se han logrado establecer cultivos de largo plazo de SSC de ratón, ratas y hámsters (Kubota *et al.*, 2004a; Ryu *et al.*, 2005), por lo que es importante analizar las diferentes variables que podrían afectar el desarrollo del cultivo *in vitro* de las células madre espermato goniales de la alpaca. Entre ello, es fundamental la elección de un determinado medio, donde DMEM (alta glucosa) y DMEM/F12 son los más empleados para cultivos de SSC de animales domésticos (Zhu *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2013b) y StemPro para cultivos de largo plazo de SSC de ratón y hámsters (Kuijk *et al.*, 2009). En este estudio, se optó por el medio DMEM previamente empleado en el laboratorio y el cual ha brindado óptimos resultados. Otro punto importante es el uso apropiado de factores de crecimiento a incluir en el medio de cultivo, siendo el GDNF uno de los más resaltantes y muy empleado en cultivos de largo plazo para lograr el mantenimiento y autorrenovación de las SSC de murinos; sin embargo, Lee y su equipo (2013) reportó

la expresión de receptores Gfra1 en la superficie de gonocitos de verracos, demostrando que el GDNF no solo cumpliría roles indispensables en cultivos de SSC de murinos sino también en especies de mayor tamaño (Lee *et al.*, 2013); en cambio, la función y efectos de otros factores de crecimiento como EGF, FGF, LIF, CSF1, IGF, TGF- β siguen siendo imprecisas. En este trabajo, se empleó suero de leche materna como fuente de dichos factores de crecimiento, aunque sin conocer la proporción exacta de éstos; no obstante, se observó la formación de colonias y la progresión de los cultivos celulares, así como lo registrado en el trabajo de Valdivia (2019a). Asimismo, el suero y las células alimentadores o de soporte de las SSC también son parte importante del sistema de cultivo y aunque recientemente se ha establecido medios libre de suero para las SSC de ratón, se ha registrado que su uso no es factible para cultivar SSC de animales mayores (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2011). Por ello, el suero aquí empleado fue el SBF, que al igual que el BSA son suplementos del medio, aportan proteínas, aminoácidos y factores de crecimiento que favorecen la proliferación de las SSC, además de tener componentes que actúan como catalizador para el crecimiento de células somáticas (Zheng *et al.*, 2014). Con el objetivo de mantener las características de las SSC en cultivo y mantener su proliferación, la concentración de suero fue de 1% dado que reportes con cultivos de células testiculares de chivo y toro indican que a muy altas concentraciones el suero tendría efectos adversos en la sobrevivencia de las SSC y podría inducir a la diferenciación celular (Zheng *et al.*, 2013b; Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2011). Siguiendo dicha premisa, los cultivos de SSC fueron suplementados con SBF 1% y BSA 0.5% observando un incremento de las células sDBA+ comparados a sus respectivos grupos iniciales (Control y Post Percoll) mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia (Gráficos 4 y 6). Entretanto, existe otro factor importante que viene siendo muy estudiado para el mantenimiento de cultivos de las SSC (preferentemente de especies de gran tamaño) como son las células de Sertoli autólogas; éstas cumplen el rol principal como parte del nicho de las SSC, por lo que son empleadas como monocapas de alimentación para las SSC, interactúan físicamente

y secretan una variedad de citoquinas y factores de crecimiento como el GDNF, resaltante por promover la proliferación y regular el mantenimiento de las células madre espermato goniales, así como su diferenciación a los avanzados tipos de células germinales (Jégou *et al.*, 1991; Zheng *et al.*, 2014).

Las condiciones para el crecimiento al igual que el proceso de aislamiento de las células de Sertoli son distintas a las de las SSC. Si bien se realizó el mismo protocolo de aislamiento celular mediante digestiones enzimáticas, se empleó medio Hank's libre de Ca^{+2} y Mg^{+2} para la obtención de las células de Sertoli individuales. Estos iones son utilizados por proteínas de adhesión de membrana para crear la adhesión célula-célula y célula-substrato, y dado que el medio Hank's presenta el ión bicarbonato (HCO_3^-) que normalmente en presencia de cationes polivalentes como Ca^{+2} y Mg^{+2} forma complejos insolubles, actuaría robando aquellos iones necesarios para las proteínas de adhesión dando como resultado la disociación de las células (Takeichi y Okada, 1972). De esta manera se buscó separar los diferentes tipos celulares, germinales o somáticas; y purificar el aislamiento siguiendo los lineamientos propuestos por Scarpino en 1998 basado en la unión selectiva a la lectina DSA mediante los residuos N-acetil-D-glucosamina presente en la superficie de las células de Sertoli. Mediante algunos ensayos se probaron tres distintas concentraciones de DSA (5, 10 y 15 $\mu\text{g/ml}$), determinando que la concentración y el tiempo óptimo de incubación para que la lectina se adhiera a los pocillos de la placa era de 5 $\mu\text{g/ml}$ y 1-2 horas en medio DMEM + 10%SBF. Además, se determinó 28h de incubación de la lectina con el pool de células testiculares como tiempo mínimo requerido para la máxima adherencia de las células de Sertoli, tiempo mucho mayor al establecido en el estudio de Scarpino con las células de Sertoli de rata (4-5 horas), lo que se debería a las diferentes especies trabajadas, además de la edad de dichos individuos. Esta técnica ha sido elegida por su sencillez, la rapidez de su uso y la homogeneidad de las células aisladas con alto grado de pureza, las cuales según el estudio de Scarpino son solamente células de Sertoli funcionales dado que producen cAMP en respuesta a factores mitógenos como FSH, demostrando

que las propiedades funcionales de las células de Sertoli preparadas por este método se mantienen *in vitro*, además de no verse afectada su proliferación (Scarpino, 1998). Esto propone a este método como ideal para estudiar la regulación de la proliferación de las células de Sertoli, además que representa menos estrés a las células comparado a otros métodos basados en la selección celular mediante el aumento de temperatura por 3-4 días de cultivo (Welsh y Wiebe, 1975) o mediante breves tratamientos hipotónicos (Galdieri *et al.*, 1981) con el fin de eliminar las células germinales.

Como ya se mencionó, el suero cumple una función importante en el establecimiento de los cultivos celulares. Estudios han demostrado que concentraciones altas de suero podría inducir la diferenciación de las SSC, además de promover a inicios del cultivo la rápida formación de colonias de este grupo celular y simultáneamente el crecimiento extensivo de las células de Sertoli, el cual poco a poco iría inhibiendo la propagación de las SSC (Bahadorani *et al.*, 2012). Cultivos *in vitro* de SSC de ratón a concentraciones de 0.3% - 2% de suero registró el crecimiento de éstas, así como del lento crecimiento de las células de Sertoli, viéndose las SSC adheridas a las células somáticas y con formación de colonias al cabo de 5-7 días; en cambio, en los cultivos con concentraciones altas de suero (5% - 15%) si bien también se formaron colonias de SSC en contacto con las células de Sertoli, éstas fueron desapareciendo conforme se realizaba el rápido crecimiento de las células de Sertoli (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2005). Se obtuvieron resultados similares en cultivos de SSC de chivo, bovino y cerdo (Bahadorani *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2013b), por lo que en este trabajo se optó por realizar cultivos de SSC purificadas por gradientes de Percoll con 1% SBF, mientras que el medio de cultivo para las células de Sertoli fue suplementado con 10% SBF.

Se compararon los crecimientos celulares de los co-cultivos versus sus cultivos control. En una primera evaluación vista al microscopio invertido se pudo evidenciar que la proliferación de las células madre espermato goniales de alpaca en los co-cultivos era mucho mayor y más rápida que en su respectivo control en los primeros 3-4 días de cultivo, con la aparición de colonias de SSC vistas como racimos desde el segundo día

de co-cultivo. Los resultados en este trabajo se pueden comparar a estudios con células testiculares de ratón donde se analizan la formación de colonias de SSC adultas bajo diferentes condiciones de cultivo, el empleo de factores de crecimiento como el GDNF (factor neurotrófico derivado de la línea celular glial), SCF (factor de célula madre) y GM-CSF (factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos), además del co-cultivo con células de Sertoli. Aquí se pudo demostrar que en el co-cultivo de corto tiempo, las células de Sertoli pueden influenciar en la proliferación *in vitro* de las células madre espermatogoniales incrementando el número y diámetro de las colonias, mostrando un mejor efecto en contraste a los cultivos suplementados con los factores de crecimiento. Además, dichas colonias aparecieron aproximadamente desde el cuarto día del co-cultivo, tres días antes que en los otros grupos, con una disminución progresiva luego de 2-3 semanas de cultivo (Koruji *et al.*, 2009), aunque ello probablemente se debería a los subcultivos de las colonias formadas al final de la primera semana, al proceso de apoptosis celular o a la diferenciación de las células germinales (Aponte *et al.*, 2006). Otros estudios con células de chivo y bovino también han demostrado un aumento en la proliferación de las SSC cuando éstas se co-cultivan con células de Sertoli (Pramod y Mitra 2014; Cai *et al.*, 2016), siendo en este último estudio en donde se trabajó con células de tejido testicular criopreservadas de bovino adulto, que se pone de relieve las complejas interacciones entre ambos grupos celulares en cultivo, así como se da *in vivo*, afirmando que la monocapa de células de Sertoli facilita la inicial adherencia de las SSC por expansión de su área de contacto y su posterior proliferación con la aparición de colonias más rápidamente formadas que en los cultivos sin las células de Sertoli. En los co-cultivos también se pudo observar la progresión del aumento de las espermatogonias únicas (single), pareadas (paired), en cadena (aligned) y la formación de quistes sincitiales de espermatogonia luego de la primera semana de cultivo o inmediatamente después de los subcultivos (Cai *et al.*, 2016), así como también se pudo observar en este trabajo con co-cultivos de SSC y células de Sertoli de alpaca luego de aproximadamente dos semanas (Figura 19H,

Figura 20). Estas observaciones demuestran que las colonias de SSC soportadas por las células de Sertoli no solo son capaces de proliferar *in vivo*, sino también *in vitro*, demostrando ser un sistema óptimo capaz de inducir la espermatogénesis en receptores infértiles después de la trasplantación, tal como lo sugiere Koruji y colegas (2009).

Respaldando los registros visuales de los cultivos celulares de la presente investigación, la evaluación mediante microscopía de fluorescencia demostró un mayor porcentaje de células sDBA+ en la gran mayoría de los co-cultivos (Gráfico 7), así como también lo señala la evaluación de la muestra evaluada por citometría de flujo, aquella con el periodo de cultivo más largo (Tabla 17, Figura 21). Estos resultados indicarían que las células de Sertoli en los cultivos de corto tiempo (16 días) promueven la proliferación de las SSC de alpaca, mas no la diferenciación celular. Por ello, se recomienda aumentar el tiempo de cultivo y así determinar las diferencias en cuanto a la función y efecto de las células de Sertoli; aumentar el número muestral, emplear marcadores moleculares u otras técnicas de identificación de células de Sertoli y someter los resultados a una validación adicional a fin de reforzar lo obtenido. No obstante, estos hallazgos marcan un avance en el área aún poco estudiada de cultivos de células testiculares de alpaca, donde se ha demostrado la eficacia de las gradientes de Percoll para enriquecer la baja población de SSC e incluso promover el progreso de dichos cultivos con la adición de células de Sertoli con el objetivo de rescatar y conservar la diversidad genética de las alpacas adultas, una especie ícono y de gran importancia socioeconómica para nuestro país.

CONCLUSIONES

- ✓ La gradiente de densidad de Percoll enriquece la población de células madre espermato goniales (SSC) de alpaca aisladas mediante digestiones enzimáticas.
- ✓ El protocolo de aislamiento enzimático de células testiculares establecido permite obtener concentraciones y viabilidades de SSC aptas que optimicen el proceso de enriquecimiento por las gradientes de Percoll.
- ✓ El empleo de las gradientes de Percoll no afecta la viabilidad de las SSC.
- ✓ El uso de la lectina DSA permite aislar células de Sertoli de alpaca de manera rápida, sencilla y sin afectar la capacidad de proliferación *in vitro* de dichas células.
- ✓ En co-cultivos de corto plazo, el empleo de monocapas de células de Sertoli incrementa la proliferación de las células madre espermato goniales previamente enriquecidas mediante las gradientes de Percoll.

RECOMENDACIONES

- ✓ Mejorar las condiciones de envío de las muestras biológicas como el tiempo de traslado y el control sostenido de temperaturas que mantengan la viabilidad celular.
- ✓ Emplear otras técnicas de enriquecimiento de células madre espermatogoniales, sumadas al uso de las gradientes de Percoll a fin de aumentar la pureza de las SSC.
- ✓ Estudiar la dinámica de proliferación de las SSC para mejorar los requerimientos nutricionales en cultivo.
- ✓ Emplear otras técnicas de identificación de células de Sertoli como el uso de marcadores moleculares.
- ✓ Aumentar el número de co-cultivos a fin de soportar estadísticamente los resultados.
- ✓ Evaluar el comportamiento de las SSC enriquecidas con y sin células de Sertoli en cultivo durante un periodo de tiempo más prolongado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ✓ Abbasi, H., Tahmoorespur, M., Hosseini, S. M., Nasiri, Z., Bahadorani, M., Hajian, M., Nasiri, M. R. & Nasr-Esfahani, M. H. (2013). THY1 as a reliable marker for enrichment of undifferentiated spermatogonia in the goat. *Theriogenology*, 80(8), 923-932.
- ✓ Adams, G. P., & Ratto, M. H. (2013). Ovulation-inducing factor in seminal plasma: a review. *Animal reproduction science*, 136(3), 148-156
- ✓ Aeckerle, N., Eildermann, K., Drummer, C., Ehmcke, J., Schweyer, S., Lerchl, A., ... & Behr, R. (2012). The pluripotency factor LIN28 in monkey and human testes: a marker for spermatogonial stem cells? *Molecular human reproduction*, 18(10), 477-488.
- ✓ Aguilar, J., López, M. C. G., Clavero, A., Ortiz, A., González, E., Galisteo, J. O., ... & Castilla, J. A. (2004). Células madre espermatogonias. *Revista internacional de Andrología: salud sexual y reproductiva*, 2(2), 54-59.
- ✓ Ahmad, S., Xiao, Y., Han, L., Hua, H., Riaz, H., Liang, A., & Yang, L. G. (2013). Isolation, identification and enrichment of type a spermatogonia from the testis of chinese cross-bred buffaloes (swamp× river). *Reproduction in Domestic Animals*, 48(3), 373-381.
- ✓ Aliakbari, F., Gilani, M. A. S., Amidi, F., Baazm, M., Korouji, M., Izadyar, F., ... & Abbasi, M. (2016). Improving the efficacy of cryopreservation of spermatogonia stem cells by antioxidant supplements. *Cellular Reprogramming (Formerly" Cloning and Stem Cells")*, 18(2), 87-95.
- ✓ Aloisio, G. M., Nakada, Y., Saatcioglu, H. D., Peña, C. G., Baker, M. D., Tarnawa, E. D., ... & Amatruda, J. F. (2014). PAX7 expression defines germline stem cells in the adult testis. *The Journal of clinical investigation*, 124(9), 3929-3944.

- ✓ Aponte, P. M., Soda, T., Van De Kant, H. J. G., & de Rooij, D. G. (2006). Basic features of bovine spermatogonial culture and effects of glial cell line-derived neurotrophic factor. *Theriogenology*, 65(9), 1828-1847.
- ✓ Assis, L. H. C., Crespo, D., Morais, R. D. V. S., França, L. R., Bogerd, J., & Schulz, R. W. (2016). INSL3 stimulates spermatogonial differentiation in testis of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Cell and tissue research*, 363(2), 579-588.
- ✓ Aumüller, G., Schulze, C., & Viebahn, C. (1992). Intermediate filaments in Sertoli cells. *Microscopy research and technique*, 20(1), 50-72.
- ✓ AWONIYI, C. A., SANTULLI, R., SPRANDO, R. L., EWING, L. L., & Zirkin, B. R. (1989). Restoration of advanced spermatogenic cells in the experimentally regressed rat testis: quantitative relationship to testosterone concentration within the testis. *Endocrinology*, 124(3), 1217-1223.
- ✓ Bahadorani, M., Hosseini, S. M., Abedi, P., Hajian, M., Hosseini, S. E., Vahdati, A., ... & Nasr-Esfahani, M. H. (2012). Short-term in-vitro culture of goat enriched spermatogonial stem cells using different serum concentrations. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 29(1), 39-46.
- ✓ Barakat, B., O'Connor, A. E., Gold, E., de Kretser, D. M., & Loveland, K. L. (2008). Inhibin, activin, follistatin and FSH serum levels and testicular production are highly modulated during the first spermatogenic wave in mice. *Reproduction*, 136(3), 345-359.
- ✓ Bedford-Guaus S. J. et al. Molecular markers of putative spermatogonial stem cells in the domestic cat. *Reproduction in domestic animals*, 2017, vol. 52, p. 177-186
- ✓ Bellve, A. R., Cavicchia, J. C., Millette, C. F., O'brien, D. A., Bhatnagar, Y. M., & Dym, M. (1977). Spermatogenic cells of the prepuberal mouse: isolation and morphological characterization. *Journal of Cell Biology*, 74(1), 68-85.
- ✓ Berensztejn, E. B. (1998). *Cultivo primario de células testiculares prepúberes humanas: Cambios madurativos de la regulación de la esteroidogénesis*

(Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires).

- ✓ Bernard Robaire, Barry T. Hinton, in Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition), 2015.
- ✓ Binsila, K. B., Selvaraju, S., Ghosh, S. K., Parthipan, S., Archana, S. S., Arangasamy, A., ... & Ravindra, J. P. (2018). Isolation and enrichment of putative spermatogonial stem cells from ram (*Ovis aries*) testis. *Animal reproduction science*, 196, 9-18.
- ✓ Blombach, B., & Takors, R. (2015). CO₂–intrinsic product, essential substrate, and regulatory trigger of microbial and mammalian production processes. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 3, 108.
- ✓ Borjigin, U., Davey, R., Hutton, K., & Herrid, M. (2010). Expression of promyelocytic leukaemia zinc-finger in ovine testis and its application in evaluating the enrichment efficiency of differential plating. *Reproduction, Fertility and Development*, 22(5), 733-742.
- ✓ Borjigin, U., Davey, R., Hutton, K., & Herrid, M. (2010). Expression of promyelocytic leukaemia zinc-finger in ovine testis and its application in evaluating the enrichment efficiency of differential plating. *Reproduction, Fertility and Development*, 22(5), 733-742.
- ✓ Braun, R. E., Sharma, M., Srivastave, A., Fairfield, H. E., & Bergstrom, D. E. (2017). Identification of Slow-Cycling Long-Term Spermatogonial Stem Cells and their Regulation by PLZF. *In Society for the Study of Reproduction* (p. 279).
- ✓ Bravo, P. W., Skidmore, J. A., & Zhao, X. X. (2000). Reproductive aspects and storage of semen in Camelidae. *Animal Reproduction Science*, 62(1), 173-193. doi:10.1016/s0378-4320(00)00158-5
- ✓ Braydich-Stolle, L., Kostereva, N., Dym, M., & Hofmann, M. C. (2007). Role of Src family kinases and N-Myc in spermatogonial stem cell proliferation. *Developmental biology*, 304(1), 34-45.

- ✓ Bremner, W. J., Millar, M. R., Sharpe, R. M., & Saunders, P. T. (1994). Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. *Endocrinology*, 135(3), 1227-1234.
- ✓ Brinster, R. L., & Zimmermann, J. W. (1994). Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(24), 11298-11302.
- ✓ Buaas F, Kirsh A, Sharma M, Mclean DJ, Morris J, et al. (2004) Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat Genet.* 36: 647–652.
- ✓ Bustos-Obregon, E. (1970). On Sertoli cell number and distribution in rat testis. *Archives de biologie*, 81(1), 99-108.
- ✓ Buzzard, J. J., Farnworth, P. G., de Kretser, D. M., O'Connor, A. E., Wreford, N. G., & Morrison, J. R. (2003a). Proliferative phase Sertoli cells display a developmentally regulated response to activin *in vitro*. *Endocrinology*, 144(2), 474-483.
- ✓ Buzzard, J. J., Wreford, N. G., & Morrison, J. R. (2003b). Thyroid hormone, retinoic acid, and testosterone suppress proliferation and induce markers of differentiation in cultured rat Sertoli cells. *Endocrinology*, 144(9), 3722-3731.
- ✓ Byskov AG & Hoyer PE (1994) Embryology of mammalian gonads and ducts. *The Physiology of Reproduction*, edn 5, pp 75–86. Eds E Knobil and JD Neill. New York: Raven Press.
- ✓ Cai, H., Wu, J. Y., An, X. L., Zhao, X. X., Wang, Z. Z., Tang, B., ... & Zhang, X. M. (2016). Enrichment and culture of spermatogonia from cryopreserved adult bovine testis tissue. *Animal reproduction science*, 166, 109-115.
- ✓ Campos-Junior, P. H. A., Costa, G. M., Lacerda, S. M., Rezende-Neto, J. V., de Paula, A. M., Hofmann, M. C., & de França, L. R. (2012). The spermatogonial stem cell niche in the collared peccary (*Tayassu tajacu*). *Biology of reproduction*, 86(5), 155-1.

- ✓ CENAGRO, I. V. IV Censo Nacional Agropecuario. Resultados finales. INEI Lima Perú, 2012.
- ✓ Chatelain PG, Ruitton A, Naville D, Perrard-Sapori MH. Frédéric F. Saez JM. Bertrand J. (1986b) SomatomedinC secretion by Sertoli cells in vitro: characterization and regulation. *European Society for Pediatric Endocrinology*. 25th Meeting, Zurich: Abstr. 85.
- ✓ Chatelain PG. Ruitton A. Naville D. Perrard-Sapori MH. Frédéric F, Saez JM. Bertrand J. (1986a) Characterization of Sertoli cell somatomedin-C: paracrine (Leydig cells) and autocrine (Sertoli cells) role. *European Society for Pediatric Endocrinology*. 25th Meeting. Zurich: Abstr. 83.
- ✓ Chauvigné, F., Zapater, C., Gasol, J. M., & Cerdà, J. (2014). Germ-line activation of the luteinizing hormone receptor directly drives spermiogenesis in a nonmammalian vertebrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(4), 1427-1432.
- ✓ Chen, L. Y., Willis, W. D., & Eddy, E. M. (2016a). Targeting the Gdnf Gene in peritubular myoid cells disrupts undifferentiated spermatogonial cell development. *Proceedings of the national academy of sciences*, 113(7), 1829-1834.
- ✓ Chen, Y., Ma, L., Hogarth, C., Wei, G., Griswold, M. D., & Tong, M. H. (2016b). Retinoid signaling controls spermatogonial differentiation by regulating expression of replication-dependent core histone genes. *Development*, 143(9), 1502-1511.
- ✓ Chiarini-Garcia H, Alves-Freitas D, Barbosa IS, Almeida FR (2009) Evaluation of the seminiferous epithelial cycle, spermatogonial kinetics and niche in donkeys (*Equus asinus*). *Anim Reprod Sci*. 116: 139–154
- ✓ Clermont Y, Perey B. Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *Am J Anat*. 1957; 100:241–67
- ✓ Costa, G. M., Avelar, G. F., Rezende-Neto, J. V., Campos-Junior, P. H. A.,

- Lacerda, S. M., Andrade, B. S., ... & Franca, L. R. (2012). Spermatogonial stem cell markers and niche in equids. *PloS one*, 7(8), e44091.
- ✓ Costoya, J. A., Hobbs, R. M., Barna, M., Cattoretti, G., Manova, K., Sukhwani, M., Orwig, K. E., Wolgemuth, D. J., Pandolfi, P. P. (2004). Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nature genetics*, 36(6), 653-659.
 - ✓ Crowley, J. F., Goldstein, I. J., Arnarp, J., & Lonngren, J. (1984). Carbohydrate binding studies on the lectin from *Datura stramonium* seeds.
 - ✓ Culty M. 2009 Gonocytes, the forgotten cells of the germ cell lineage. *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today: Reviews* 87 1–26
 - ✓ Cupp, A. S., & Skinner, M. K. (2001). Expression, action, and regulation of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor during embryonic and perinatal rat testis development. *Journal of andrology*, 22(6), 1019-1029.
 - ✓ Dadoune, J. P. (2007). New insights into male gametogenesis: what about the spermatogonial stem cell niche?. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 45(3), 141-147.
 - ✓ de Franca, L. R., Hess, R. A., Cooke, P. S., & Russell, L. D. (1995). Neonatal hypothyroidism causes delayed Sertoli cell maturation in rats treated with propylthiouracil: evidence that the Sertoli cell controls testis growth. *The Anatomical Record*, 242(1), 57-69.
 - ✓ De Jong FH. Smith SD. van der Molen HJ. (1979) Bioassay of inhibin-like activity using pituitary cells in vitro. *J. Endocrinol.* 80: 91-102.
 - ✓ de Kretser, D. M., Loveland, K. L., Meinhardt, A., Simorangkir, D., & Wreford, N. (1998). Spermatogenesis. *Human reproduction*, 13(suppl_1), 1-8.
 - ✓ de Rooij, D. G., & Russell, L. D. (2000). All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *Journal of andrology*, 21(6), 776-798.
 - ✓ Dirami, G., Ravindranath, N., Pursel, V., & Dym, M. (1999). Effects of stem cell factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor on survival of

porcine type A spermatogonia cultured in KSOM. *Biology of reproduction*, 61(1), 225-230.

- ✓ Dym, M., & Fawcett, D. W. (1970). The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biology of reproduction*, 3(3), 308-326
- ✓ Eikvar LE. Levy FO. Attramadal J. Jutte NHPM. Ritzen EM. Horn R. Hansson V. (1984) Glucagon-stimulated cyclic AMP formation in rat Sertoli cells: inhibitory effects of adenosine. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 438: 563-565.
- ✓ Eildermann, K., Aeckerle, N., Debowski, K., Godmann, M., Christiansen, H., Heistermann, M., ... & Ehmcke, J. (2012). Developmental expression of the pluripotency factor sal-like protein 4 in the monkey, human and mouse testis: restriction to premeiotic germ cells. *Cells Tissues Organs*, 196(3), 206-220.
- ✓ FAKUNDING, J. L., & MEANS, A. R. (1977). Characterization and follicle stimulating hormone activation of Sertoli cell cyclic AMP-dependent protein kinases. *Endocrinology*, 101(5), 1358-1368.
- ✓ Fawcett, D. W. (1970). Electron microscopic observations on the structural components of the blood-testis barrier. *J Reprod Fert*, 10, 105-122.
- ✓ Fayomi, A. P. & Orwig, K. E. (2018). Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men. *Stem cell research*, 29, 207-214
- ✓ França, L. R., Avelar, G. F., & Almeida, F. F. (2005). Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*, 63(2), 300-318.
- ✓ Freshney, R. I. (2010). Chapter 11 Primary Culture. *Culture of animal cell: A manual of basic technique and specialized application*, 6th ed. (pp. 163–186). New Jersey, NY: Wiley-Blackwell.
- ✓ Frisch J. L. (1775) Das Natur-System der vierfüssigen Thiere. *Glogau*. 40 pp.
- ✓ Fritz IB. (1978) Sites of action of androgens and follicle stimulating hormone on cells of the seminiferous tubule. In: *Biochemical actions of hormones*. Vol. V (Ed.

G Litwack) Acad. Press. New York. pp: 249-281.

- ✓ Fritz, I. B., Rommerts, F. G., Louis, B. G., & Dorrington, J. H. (1976). Regulation by FSH and dibutyryl cyclic AMP of the formation of androgen-binding protein in Sertoli cell-enriched cultures. *Reproduction*, 46(1), 17-24.
- ✓ Fröjdman, K., Harley, V. R., & Pelliniemi, L. J. (2000). Sox9 protein in rat sertoli cells is age and stage dependent. *Histochemistry and cell biology*, 113(1), 31-36.
- ✓ Fujihara, M., Kim, S. M., Minami, N., Yamada, M., & Imai, H. (2011). Characterization and in vitro culture of male germ cells from developing bovine testis. *Journal of Reproduction and Development*, 1101260348-1101260348.
- ✓ GALDIERI, M., ZIPARO, E., PALOMBI, F., RUSSO, M. A., & STEFANINI, M. (1981). Pure sertoli cell cultures: A new model for the study of somatic—germ cell interactions. *Journal of Andrology*, 2(5), 249-254.
- ✓ García-Lopez, A., Bogerd, J., Granneman, J. C., van Dijk, W., Trant, J. M., Taranger, G. L., & Schulz, R. W. (2009). Leydig cells express follicle-stimulating hormone receptors in African catfish. *Endocrinology*, 150(1), 357-365.
- ✓ Gassei, K., & Orwig, K. E. (2013). SALL4 expression in gonocytes and spermatogonial clones of postnatal mouse testes. *PloS one*, 8(1), e53976.
- ✓ Gassei, K., Ehmcke, J., Dhir, R., & Schlatt, S. (2010). Magnetic activated cell sorting allows isolation of spermatogonia from adult primate testes and reveals distinct GFRa1-positive subpopulations in men. *Journal of medical primatology*, 39(2), 83-91.
- ✓ Gely-Pernot, A., Raverdeau, M., Teletin, M., Vernet, N., Féret, B., Klopfenstein, M., ... & Ghyselinck, N. B. (2015). Retinoic acid receptors control spermatogonia cell-fate and induce expression of the SALL4A transcription factor. *PLoS Genet*, 11(10), e1005501.
- ✓ Gentry, A., Clutton-Brock, J., & Groves, C. P. (2004). The naming of wild animal species and their domestic derivatives. *Journal of Archaeological Science*, 31(5), 645-651.

- ✓ Goel, S., Reddy, N., Mahla, R. S., Suman, S. K., & Pawar, R. M. (2011). Spermatogonial stem cells in the testis of an endangered bovid: Indian black buck (*Antilope cervicapra* L.). *Animal reproduction science*, 126(3-4), 251-257.
- ✓ Goel, S., Reddy, N., Mandal, S., Fujihara, M., Kim, S. M., & Imai, H. (2010). Spermatogonia-specific proteins expressed in prepubertal buffalo (*Bubalus bubalis*) testis and their utilization for isolation and in vitro cultivation of spermatogonia. *Theriogenology*, 74(7), 1221-1232.
- ✓ Goel, S., Sugimoto, M., Minami, N., Yamada, M., Kume, S., & Imai, H. (2007). Identification, isolation, and in vitro culture of porcine gonocytes. *Biology of Reproduction*, 77(1), 127-137.
- ✓ Goertz, M. J., Wu, Z., Gallardo, T. D., Hamra, F. K., & Castrillon, D. H. (2011). Foxo1 is required in mouse spermatogonial stem cells for their maintenance and the initiation of spermatogenesis. *The Journal of clinical investigation*, 121(9), 3456-3466.
- ✓ Grinspon, R. P., & Rey, R. A. (2010). Anti-müllerian hormone and sertoli cell function in paediatric male hypogonadism. *Hormone Research in Paediatrics*, 73(2), 81-92.
- ✓ Griswold MD (2016) Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiol Rev* 96(1):1–17
- ✓ Griswold, M. D. (1988). Protein secretions of Sertoli cells. *Int Rev Cytol*, 110 (133), 133-56.
- ✓ Griswold, M. D. (1995). Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biology of reproduction*, 52(2), 211-216.
- ✓ Grootegoed JA. Jansen R. van der Molen HJ. (1984) The role of glucose, pyruvate and lactate in ATPproduction by rat spermatocytes and spermatids. *Biochim. Biophys. Acta* 767: 248-256.
- ✓ Grootegoed JA. Jutte NHPM. Jansen R. Heusdens FA, Rommerts FFG, van der Molen HJ. (1981) Biochemistry of spermatogenesis. The supporting rol of Sertoli cells. In: *Research on Steroids*, Vol X. (Ed. HJ van der Molen, A Klopper, B

Lunenfeld, M Neves de Castro, F Sciarra, A Vermeulen) Excerpta Medica. Amsterdam. pp:169-183.

- ✓ Ha, T. Y., Ahn, M. J., Lee, Y. D., Yang, J. H., Kim, H. S., & Shin, T. K. (2003). Histochemical detection of glycoconjugates in the male reproductive system of the horse. *Journal of veterinary science*, 4(1), 21-28.
- ✓ Hall K, Ritzen EM. Johnsonbaugh RE, Parvinen M. (1983) Pubertal rise of immunoreactive somatomedin and its eventual source. In: Insulin-like growth factors/somatomedins: basic Chemistry, biology, clinical importance. (Ed. EM Spencer) Walter de Gruyter, NewYork, pp: 611-614.
- ✓ Han, I., Sylvester, S. R., Kim, K. H., Schelling, M. E., Venkateswaran, S. U. B. R. A. M. A. N. I. A. M., Blanckaert, V. D., ... & Griswold, M. D. (1993). Basic fibroblast growth factor is a testicular germ cell product which may regulate Sertoli cell function. *Molecular Endocrinology*, 7(7), 889-897.
- ✓ Hansson V., Mc Lean US., Smith AA., Tindall DJ., Ueddington SC., Nayfeh SN., French FS. (1974) Androgen receptors in rat testis. *Steroids* 23: 823-832.
- ✓ Hansson V., Ueddington SC., Naess O, Altramadal A., French FS., Kotite N., Nayfeh S. (1975) Testicular androgen binding protein (ABP): a parameter of Sertoli cell secretory function. In: Hormonal regulation of spermatogenesis. (Eds. FS French, V Hansson, EM
- ✓ He, Y., Chen, X., Zhu, H., & Wang, D. (2015). Developments in techniques for the isolation, enrichment, main culture conditions and identification of spermatogonial stem cells. *Cytotechnology*, 67(6), 921-930.
- ✓ Heidari, B., Gifani, M., Shirazi, A., Zarnani, A. H., Baradaran, B., Naderi, M. M., ... & Akhondi, M. M. (2014). Enrichment of undifferentiated type A spermatogonia from goat testis using discontinuous percoll density gradient and differential plating. *Avicenna journal of medical biotechnology*, 6(2), 94.
- ✓ Heidari, B., Rahmati-Ahmadabadi, M., Akhondi, M. M., Zarnani, A. H., Jeddi-Tehrani, M., Shirazi, A., Naderi, M. M. & Behzadi, B. (2012). Isolation,

identification, and culture of goat spermatogonial stem cells using c-kit and PGP9.5 markers. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 29(10), 1029-1038.

- ✓ Hermann, B. P., Sukhwani, M., Hansel, M. C., & Orwig, K. E. (2010). Spermatogonial stem cells in higher primates: are there differences to those in rodents? *Reproduction (Cambridge, England)*, 139(3), 479.
- ✓ Hermann, B. P., Sukhwani, M., Simorangkir, D. R., Chu, T., Plant, T. M., & Orwig, K. E. (2009). Molecular dissection of the male germ cell lineage identifies putative spermatogonial stem cells in rhesus macaques. *Human reproduction*, 24(7), 1704-1716.
- ✓ Herrid, M., Davey, R. J., and Hill, J. R. (2007). Characterization of germcells from pre-pubertal bull calves in preparation for germcell transplantation. *Cell Tissue Res.* 330, 321–329. doi:10.1007/S00441-007-0445-Z
- ✓ Herrid, M., Davey, R. J., Hutton, K., Colditz, I. G., & Hill, J. R. (2009). A comparison of methods for preparing enriched populations of bovine spermatogonia. *Reproduction, Fertility and Development*, 21(3), 393-399.
- ✓ Herrid, M., Vignarajan, S., Davey, R., Dobrinski, I., & Hill, J. R. (2006). Successful transplantation of bovine testicular cells to heterologous recipients. *Reproduction*, 132(4), 617-624.
- ✓ Hobbs RM, Seandel M, Falciatori I, Rafii S, Pandolfi PP (2010) Plzf regulates germline progenitor self-renewal by opposing mTORC1. *Cell* 142(3):468–479
- ✓ Hobbs, R. M., Fagoonee, S., Papa, A., Webster, K., Altruda, F., Nishinakamura, R., ... & Pandolfi, P. P. (2012). Functional antagonism between Sall4 and Plzf defines germline progenitors. *Cell stem cell*, 10(3), 284-298.
- ✓ Hofmann, M. C., Braydich-Stolle, L., & Dym, M. (2005). Isolation of male germline stem cells; influence of GDNF. *Developmental biology*, 279(1), 114-124.
- ✓ Hu, J., Shima, H., and Nakagawa, H. (1999). Glial cell line derived neurotrophic factor stimulates Sertoli cell proliferation in the early postnatal period of rat testis

development. *Endocrinology* 140(8), 3416–3421

- ✓ Huamaní Alvarado, J. (2018). Determinación de viabilidad y rendimiento durante el aislamiento de espermatogonias de *Vicugna pacos* “alpaca” a diferentes edades.
- ✓ Huanca, N. (2016). Índice de fragmentación de ADN espermático en semen de alpacas (*Vicugna pacos*) utilizando el Integrated Semen Analysis System-ISAS (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. K'ayra, Cusco
- ✓ Huanca, T. (1996). Manual del alpaquero.
- ✓ Huckins, C. (1978). The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. *The Anatomical Record*, 190(4), 905-926.
- ✓ Huckins, C., & Clermont, Y. (1968). Evolution of gonocytes in the rat testis during late embryonic and early post-natal life. *Archives D'anatomie, D'histologie et D'embryologie Normales et Experimentales*, 51(1), 341.
- ✓ Ishii, K., Kanatsu-Shinohara, M., Toyokuni, S., & Shinohara, T. (2012). FGF2 mediates mouse spermatogonial stem cell self-renewal via upregulation of Etv5 and Bcl6b through MAP2K1 activation. *Development*, 139(10), 1734-1743.
- ✓ Izadyar, F., Spierenberg, G. T., Creemers, L. B., Ouden, K. D., & De Rooij, D. G. (2002). Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. *REPRODUCTION-CAMBRIDGE*, 124(1), 85-94.
- ✓ Jégou, B. (1991). 3 The sertoli cell. *Baillière's clinical endocrinology and metabolism*, 6(2), 273-311.
- ✓ Jégou, B. (1992). The Sertoli cell in vivo and in vitro. *Cell biology and toxicology*, 8(3), 49-54.
- ✓ Jiang, F. X., & Short, R. V. (1995). Male germ cell transplantation in rats: apparent synchronization of spermatogenesis between host and donor seminiferous epithelia. *International journal of andrology*, 18(6), 326-330.

- ✓ Johnson L (1991) Seasonal differences in equine spermatocytogenesis. *Biol Reprod.* 44: 284–291
- ✓ Johnston, D. S., Russell, L. D., & Griswold, M. D. (2000). Advances in spermatogonial stem cell transplantation. *Reviews of Reproduction*, 5(3), 183-188.
- ✓ Jutte NHPM, Grootegoed JA. Rommerts FFG, van der Molen HJ. (1981) Exogenous lactate is essential for metabolic activities in isolated rat spermatocytes and spermatids. *J. Reprod. Fertil.* 62: 399-405.
- ✓ Jutte NHPM, Jansen R. Grootegoed JA, Rommerts FFG, van der Molen HJ. (1983) FSH stimulation of the production of pyruvate and lactate by rat Sertoli cells may be involved in hormonal regulation of spermatogenesis. *J. Reprod. Fertil.* 68: 219-226.
- ✓ Jutte NPHM. Jansen R. Grootegoed JA. Rommerts FFG. Clausen ÜPF. van der Molen HJ. (1982) Regulation of survival of rat pachytene spermatocytes by lactate supply from Sertoli cells. *J. Reprod. Fertil.* 65: 431-438.
- ✓ Kadwell, M., Fernandez, M., Stanley, H. F., Baldi, R., Wheeler, J. C., Rosadio, R., & Bruford, M. W. (2001). Genetic analysis reveals the wild ancestors of the llama and the alpaca. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 268(1485), 2575-2584.
- ✓ Kanatsu-Shinohara M, Morimoto T, Toyokuni S, Shinohara T (2004b) Regulation of mouse spermatogonial stem cell self-renewing division by the pituitary gland. *Biology of Reproduction*, 70(6):1731–1737
- ✓ Kanatsu-Shinohara M, Takehashi M, Takashima S, Lee J, Morimoto H, Chuma S, Raducanu A, Nakatsuji N, Fässler R, Shinohara T (2008) Homing of mouse spermatogonial stem cells to germline niche depends on β 1-integrin. *Cell Stem Cell* 3(5):533–542
- ✓ Kanatsu-Shinohara M, Toyokuni S, Shinohara T (2004a). CD9 is a surface marker on mouse and rat male germline stem cells. *Biol Reprod* 70(1):70–75

- ✓ Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Ogonuki, N., Morimoto, H., Ogura, A., & Shinohara, T. (2011). Serum-and feeder-free culture of mouse germline stem cells. *Biology of Reproduction*, 84(1), 97-105.
- ✓ Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Inoue, K., Miki, H., Ogura, A., Toyokuni, S., & Shinohara, T. (2003). Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biology of reproduction*, 69(2), 612-616.
- ✓ Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Iwano, T., Lee, J., Kazuki, Y., Inoue, K., ... & Oshimura, M. (2005). Genetic and epigenetic properties of mouse male germline stem cells during long-term culture. *Development*, 132(18), 4155-4163.
- ✓ Kern, S., Robertson, S. A., Mau, V. J., & Maddocks, S. (1995). Cytokine secretion by macrophages in the rat testis. *Biology of reproduction*, 53(6), 1407-1416.
- ✓ Kierszenbaum, A. L. (1994). Mammalian spermatogenesis in vivo and in vitro: a partnership of spermatogenic and somatic cell lineages. *Endocrine reviews*, 15(1), 116-134.
- ✓ Kim, Y. H., Kim, B. J., Kim, B. G., Lee, Y. A., Kim, K. J., Chung, H. J., ... & Ryu, B. Y. (2013). Stage-specific embryonic antigen-1 expression by undifferentiated spermatogonia in the prepubertal boar testis. *Journal of animal science*, 91(7), 3143-3154.
- ✓ Kim, Y., Selvaraj, V., Dobrinski, I., Lee, H., McEntee, M. C., & Travis, A. J. (2006). Recipient preparation and mixed germ cell isolation for spermatogonial stem cell transplantation in domestic cats. *Journal of andrology*, 27(2), 248-256.
- ✓ Kim, Y., Turner, D., Nelson, J., Dobrinski, I., McEntee, M., & Travis, A. J. (2008). Production of donor-derived sperm after spermatogonial stem cell transplantation in the dog. *Reproduction*, 136(6), 823-831.
- ✓ Kitamura, Y., Ikeda, S., Minami, N., Yamada, M., & Imai, H. (2018). Long-term culture of undifferentiated spermatogonia isolated from immature and adult bovine testes. *Molecular Reproduction and Development*, 85(3), 236-249.

- ✓ Kodani, M., & Kodani, K. (1966). The in vitro cultivation of mammalian Sertoli cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 56(4), 1200.
- ✓ Kon, Y., Endoh, D., & Iwanaga, T. (1999). Expression of protein gene product 9.5, a neuronal ubiquitin C-terminal hydrolase, and its developing change in Sertoli cells of mouse testis. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 54(4), 333-341.
- ✓ Koruji, M., Movahedin, M., Mowla, S. J., Gourabi, H., & Arfaee, A. J. (2009). Efficiency of adult mouse spermatogonial stem cell colony formation under several culture conditions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 45(5-6), 281.
- ✓ Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. (2004a). Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*; 101: 16489-16494.
- ✓ Kubota H, Brinster RL (2018) Spermatogonial stem cells. *Biol Reprod*. 99:52–74
- ✓ Kubota, H., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. (2003). Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(11), 6487-6492.
- ✓ Kubota, H.; Avarbock, M. R.; Brinster, R. L. (2004b). Culture conditions and single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells. *Biol. Reprod*. 71: 722–731; doi:10.1095/biolreprod.104.029207.
- ✓ Kuijk, E. W., Colenbrander, B., & Roelen, B. A. (2009). The effects of growth factors on in vitro-cultured porcine testicular cells. *Reproduction*, 138(4), 721-731.
- ✓ La Manna, V., La Terza, A., Ghezzi, S., Saravanaperumal, S., Apaza, N., Huanca, T., Bozzi, R., Renieri, C. (2011). Analysis of genetic distance between Peruvian Alpaca (*Vicugna Pacos*) showing two distinct fleece phenotypes, Suri and Huacaya, by means of microsatellite markers. *Italian Journal of Animal*

Science, 10(4), e60. doi:10.4081/ijas.2011.e60.

- ✓ Lakpour, M. R., Aghajani, S., Koruji, M., Shahverdi, A., Sadighi-Gilani, M. A., Sabbaghian, M., ... & Rajabian-Naghandar, M. (2017). Isolation, culture and characterization of human sertoli cells by flow cytometry: Development of procedure. *Journal of reproduction & infertility*, 18(2), 213.
- ✓ Lamberti, D., & Vicini, E. (2014). Promoter analysis of the gene encoding GDNF in murine Sertoli cells. *Molecular and cellular endocrinology*, 394(1-2), 105-114.
- ✓ Lee, J., Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Ogonuki, N., Miki, H., Toyokuni, S., ... & Shinohara, T. (2007). Akt mediates self-renewal division of mouse spermatogonial stem cells. *Development*, 134(10), 1853-1859.
- ✓ Lee, K. H., Lee, W. Y., Kim, J. H., Yoon, M. J., Kim, N. H., Kim, J. H., ... & Song, H. (2013). Characterization of GFR α -1-Positive and GFR α -1-Negative Spermatogonia in Neonatal Pig Testis. *Reproduction in Domestic Animals*, 48(6), 954-960.
- ✓ Lichtman, J. W., & Conchello, J. A. (2005). Fluorescence microscopy. *Nature methods*, 2(12), 910-919.
- ✓ Lord, T., & Oatley, J. M. (2017). Regulation of spermatogonial stem cell maintenance and self-renewal. *In The Biology of Mammalian Spermatogonia* (pp. 91-129). Springer, New York, NY.
- ✓ Lovasco LA, Gustafson EA, Seymour KA, de Rooij DG, Freiman RN (2015) TAF4b is required for mouse spermatogonial stem cell development. *Stem Cells* 33(4):1267–1276
- ✓ Loveland, K. L., & Schlatt, S. (1997). Stem cell factor and c-kit in the mammalian testis: lessons originating from Mother Nature's gene knockouts. *Journal of Endocrinology*, 153(3), 337-344.
- ✓ Mäkelä J, Toppari J, Rivero-Müller A, Ventelä S (2014) Reconstruction of mouse testicular cellular microenvironments in long-term seminiferous tubule culture. *PLoS One* 9(3):e90088

- ✓ Makker, K., Agarwal, A., & Sharma, R. K. (2008). Magnetic activated cell sorting (MACS): utility in assisted reproduction.
- ✓ Malkov, M., Fisher, Y., & Don, J. (1998). Developmental schedule of the postnatal rat testis determined by flow cytometry. *Biology of reproduction*, 59(1), 84-92.
- ✓ Mallea LE. Machado AJ, Navaroli F, Rommerts FFG. (1966) Epidermal growth factor stimulates lactate production and inhibits aromatization in cultured Sertoli cells from immature rats. *Int. J. Androl.* 9: 201-208.
- ✓ Mallea, L. E., Machado, A. J., Navaroli, F., & Rommerts, F. F. G. (1986). Epidermal growth factor stimulates lactate production and inhibits aromatization in cultured Sertoli cells from immature rats. *International journal of andrology*, 9(3), 201-208.
- ✓ Marathe, C. K., Shetty, J., & Dighe, R. R. (1995). Selective immunoneutralization of luteinizing hormone results in the apoptotic cell death of pachytene spermatocytes and spermatids in the rat testis. *Endocrine*, 3(10), 705-709.
- ✓ Mauduit, C., Hamamah, S., & Benahmed, M. (1999). Stem cell factor/c-kit system in spermatogenesis. *Human reproduction update*, 5(5), 535-545.
- ✓ Means AR, Huckins C. (1974) Coupled events in the early biochemical actions of FSH on the Sertoli cells of the testis. In: Hormones binding and target cell activation in testis. (Eds. ML Dufau. AR Means). Plenum. New York. pp: 145-185.
- ✓ Means AR. (1970) Early effects of FSH upon testicular metabolism. *Adv. Exp. Biol. Med.* 10: 301-309.
- ✓ Means AR. (1971) Concerning the mechanism of FSH action: Rapid stimulation of testicular synthesis of nuclear RNA. *Endocrinol.* 89: 981-989.
- ✓ Means AR. Hall PF. (1967) Effect of FSH on protein biosynthesis in testis of immature rats. *Endocrinol.* 81: 1151-1160.
- ✓ MEANS, A. R., FAKUNDING, J. L., HUCKINS, C., TINDALL, D. J., & VITALE, R. (1976, January). Follicle-stimulating hormone, the Sertoli cell, and spermatogenesis. In *Proceedings of the 1975 Laurentian Hormone*

Conference (pp. 477-522). Academic Press.

- ✓ Meehan, T., Schlatt, S., O'Bryan, M. K., de Kretser, D. M., & Loveland, K. L. (2000). Regulation of germ cell and Sertoli cell development by activin, follistatin, and FSH. *Developmental biology*, 220(2), 225-237.
- ✓ Meng, J., Holdcraft, R. W., Shima, J. E., Griswold, M. D., & Braun, R. E. (2005). Androgens regulate the permeability of the blood–testis barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(46), 16696-16700.
- ✓ Meng, X., Lindahl, M., Hyvönen, M. E., Parvinen, M., de Rooij, D. G., Hess, M. W., ... & Pichel, J. G. (2000). Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science*, 287(5457), 1489-1493.
- ✓ Meroni, S. B., Galardo, M. N., Rindone, G., Gorga, A., Riera, M. F., & Cigorraga, S. B. (2019). Molecular mechanisms and signaling pathways involved in sertoli cell proliferation. *Frontiers in endocrinology*, 10, 224.
- ✓ Migrenne, S., Moreau, E., Pakarinen, P., Dierich, A., Merlet, J., Habert, R., & Racine, C. (2012). Mouse testis development and function are differently regulated by follicle-stimulating hormone receptors signaling during fetal and prepubertal life. *PLoS One*, 7(12), e53257.
- ✓ Miller, G. S. (1924). A second instance of the development of rodent-like incisors in an artiodactyl. *Proceedings of the United States National Museum*.
- ✓ Mita M. Price JM. Hall PF. (1982) Stimulation by follicle stimulating hormone of synthesis of lactate by Sertoll cells from rat testis. *Endocrinol.* 110: 1535-1541.
- ✓ Morante, R., Goyache, F., Burgos, A., Cervantes, I., Pérez-Cabal, M. A., & Gutiérrez, J. P. (2009). Genetic improvement for alpaca fibre production in the Peruvian Altiplano: the Pacamarca experience. *Animal Genetic Resources/Resources génétiques animales/Recursos genéticos animales*, 45, 37-43.
- ✓ Morena, A. R., Boitani, C., Pesce, M., De Felici, M., & Stefanini, M. (1996). Isolation of highly purified type A spermatogonia from prepubertal rat

testis. *Journal of andrology*, 17(6), 708-717.

- ✓ Mullaney, B. P., & Skinner, M. K. (1992). Basic fibroblast growth factor (bFGF) gene expression and protein production during pubertal development of the seminiferous tubule: follicle-stimulating hormone-induced Sertoli cell bFGF expression. *Endocrinology*, 131(6), 2928-2934.
- ✓ Murphy HD. (1965a) Sertoli cell stimulation following intratesticular injections of FSH In the hypophysectomized rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 118:1202-1205.
- ✓ Murphy HD. (1965b) Intratesticular assay of FSH in hypophysectomized rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 120: 671-675.
- ✓ Myers, G. M., Lambert-Messerlian, G. M., & Sigman, M. (2009). Inhibin B reference data for fertile and infertile men in Northeast America. *Fertility and sterility*, 92(6), 1920-1923.
- ✓ Naeem, A., James, N., Tanvir, M., Marriam, M., & Nathaniel, S. (2017). Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS): An Advanced Cell Sorting Technique. *PSM Biological Research*, 2(2), 83-88.
- ✓ Nagano, M., & Brinster, R. L. (1998). Spermatogonial transplantation and reconstitution of donor cell spermatogenesis in recipient mice. *Apmis*, 106(1-6), 47-57.
- ✓ Nagano, M., Ryu, B. Y., Brinster, C. J., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. (2003). Maintenance of mouse male germ line stem cells in vitro. *Biology of reproduction*, 68(6), 2207-2214.
- ✓ Naughton, C. K., Jain, S., Strickland, A. M., Gupta, A., & Milbrandt, J. (2006). Glial cell-line derived neurotrophic factor-mediated RET signaling regulates spermatogonial stem cell fate. *Biology of reproduction*, 74(2), 314-321.
- ✓ Niu, Z., Goodyear, S. M., Rao, S., Wu, X., Tobias, J. W., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. (2011). MicroRNA-21 regulates the self-renewal of mouse spermatogonial stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(31), 12740-12745.

- ✓ O'Connor, A. E., & de Kretser, D. M. (2004, August). Inhibins in normal male physiology. In *Seminars in reproductive medicine* (Vol. 22, No. 03, pp. 177-185). Copyright© 2004 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA.
- ✓ Oatley JM, Avarbock MR, Telaranta AI, Fearon DT, Brinster RL (2006) Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(25):9524–9529
- ✓ Oatley, J. M., & Brinster, R. L. (2008). Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals. *Annual review of cell and developmental biology*, 24, 263-286.
- ✓ Oatley, J. M., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. (2007). Glial cell line-derived neurotrophic factor regulation of genes essential for self-renewal of mouse spermatogonial stem cells is dependent on Src family kinase signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 282(35), 25842-25851.
- ✓ Oatley, J. M., De Avila, D. M., McLean, D. J., Griswold, M. D., & Reeves, J. J. (2002). Transplantation of bovine germinal cells into mouse testes. *Journal of animal science*, 80(7), 1925-1931.
- ✓ Oatley, J. M., Oatley, M. J., Avarbock, M. R., Tobias, J. W., & Brinster, R. L. (2009). Colony stimulating factor 1 is an extrinsic stimulator of mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Development*, 136(7), 1191-1199.
- ✓ Oatley, J. M., Reeves, J. J., & McLean, D. J. (2004). Biological activity of cryopreserved bovine spermatogonial stem cells during in vitro culture. *Biology of reproduction*, 71(3), 942-947.
- ✓ Oatley, M. J., Kaucher, A. V., Racicot, K. E., & Oatley, J. M. (2011b). Inhibitor of DNA binding 4 is expressed selectively by single spermatogonia in the male germline and regulates the self-renewal of spermatogonial stem cells in mice. *Biology of reproduction*, 85(2), 347-356.
- ✓ Oatley, M. J., Racicot, K. E., & Oatley, J. M. (2011a). Sertoli cells dictate

spermatogonial stem cell niches in the mouse testis. *Biology of reproduction*, 84(4), 639-645.

- ✓ Ogawa, T., Dobrinski, I., & Brinster, R. L. (1999). Recipient preparation is critical for spermatogonial transplantation in the rat. *Tissue and Cell*, 31(5), 461-472.
- ✓ Oonk RB. Grootegoed JA. (1987) Identification of insulin receptors on rat Sertoli cells. *Mol. Cell. Endocr.* 49:51-62.
- ✓ Oonk RB. Grootegoed JA. van der Molen HJ. (1985) Comparison of the effects of insulin and follitropin on glucose metabolism by Sertoli cells from immature rats. *Mol. Cell. Endocr.* 42: 39-48.
- ✓ Orth, J. M. (1984). The role of follicle-stimulating hormone in controlling Sertoli cell proliferation in testes of fetal rats. *Endocrinology*, 115(4), 1248-1255.
- ✓ Orth, J. M., Gunsalus, G. L., & Lamperti, A. A. (1988). Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology*, 122(3), 787-794.
- ✓ Parvinen M, Vihko KK. Toppari J. (1984) Interaction between Sertoli and germinal cells in the testis. In: Recent progress in cellular endocrinology of the testis. Vol 123. (Eds. JM Saez. MG Forest. A Dazord. J Bertrand) INSERM, Paris, pp: 387-406.
- ✓ Parvinen M, Wright ww. Phillips DM, Mather JP, Musto NA, Bardin CW. (1983) Spermatogenesis in vitro: completion of meiosis and early spermiogenesis. *Endocrinol.* 112:1150-1152.
- ✓ Pedrana G, Sloboda DM, Perez W, Newnham JP, Bielli A & Martin GB (2008). Effects of pre-natal glucocorticoids on testicular development in sheep. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 37 352–358.
- ✓ Pelliniemi, L. J., Fröjdman, K., & Paranko, J. (1993). Embryological and prenatal development and function of Sertoli cells. *The Sertoli Cell*, 87-113.
- ✓ Phillips, B. T., Gassei, K., & Orwig, K. E. (2010). Spermatogonial stem cell

regulation and spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1546), 1663-1678.

- ✓ Plöen, L., & Setchell, B. P. (1992). Blood-testis barriers revisited A homage to Lennart Nicander. *International journal of andrology*, 15(1), 1-4.
- ✓ Powell, R. H., Biancardi, M. N., Pope, C. E., Leibo, S. P., Wang, G., & Gómez, M. C. (2011). 219 Isolation and characterization of domestic cat spermatogonial cells. *Reproduction, Fertility and Development*, 24(1), 221-222.
- ✓ Pramod, R. K., & Mitra, A. (2014). In vitro culture and characterization of spermatogonial stem cells on Sertoli cell feeder layer in goat (*Capra hircus*). *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 31(8), 993– 1001. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0277-1>
- ✓ Rafeeqi, T., & Kaul, G. (2013). Isolation and enrichment of type A spermatogonia from pre-pubertal buffalo (*Bubalus bubalis*) testis. *Andrologia*, 45(3), 195-203.
- ✓ Reding, S. C., Stepnoski, A. L., Cloninger, E. W., & Oatley, J. M. (2010). THY1 is a conserved marker of undifferentiated spermatogonia in the pre-pubertal bull testis. *Reproduction*, 139(5), 893-903.
- ✓ Reyes Vasquez, J. G. (2018). Proliferación de células madre espermatogoniales (SSC) de alpaca (*Vicugna pacos*) y su posterior criopreservación.
- ✓ Ritzen EM. (1983) Chemical messengers between Sertoli cells and neighbouring cells. *J. Steroid Biochem.* 19: 499-504.
- ✓ Ritzen EM. Nayfeh SN. French FS. Dobbins MC. (1971). Demonstration of androgen binding components in rat epididymis cytosol and comparison with binding components in prostate and other tissues. *Endocrinology*. 89(1), 143-151.
- ✓ Rodriguez-Sosa, J. R., Dobson, H., & Hahnel, A. (2006). Isolation and transplantation of spermatogonia in sheep. *Theriogenology*, 66(9), 2091-2103.
- ✓ Ryu, B. Y., Kubota, H., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. (2005). Conservation of spermatogonial stem cell self-renewal signaling between mouse and

- rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(40), 14302-14307.
- ✓ Ryu, B. Y., Orwig, K. E., Oatley, J. M., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. (2006). Effects of aging and niche microenvironment on spermatogonial stem cell self-renewal. *Stem cells*, 24(6), 1505-1511.
 - ✓ Safian, D., Ryane, N., Bogerd, J., & Schulz, R. W. (2018). Fsh stimulates Leydig cell Wnt5a production, enriching zebrafish type A spermatogonia. *Journal of Endocrinology*, 239(3), 351-363.
 - ✓ Sarma, K., & Devi, J. (2012). Changes in the seminiferous epithelium of the testes during postnatal development in Assam goat. *Anatomy research international*, 2012.
 - ✓ Scadden, D. T. (2006). The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*, 441(7097), 1075-1079.
 - ✓ Scarpino, S., Morena, A. R., Petersen, C., Fröysa, B., Söder, O., & Boitani, C. (1998). A rapid method of Sertoli cell isolation by DSA lectin, allowing mitotic analyses. *Molecular and cellular endocrinology*, 146(1-2), 121-127.
 - ✓ Schepers, G., Wilson, M., Wilhelm, D., & Koopman, P. (2003). SOX8 is expressed during testis differentiation in mice and synergizes with SF1 to activate the Amh promoter in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 278(30), 28101-28108.
 - ✓ Schrans-Stassen, B. H., van de Kant, H. J., de Rooij, D. G., & van Pelt, A. M. (1999). Differential expression of c-kit in mouse undifferentiated and differentiating type A spermatogonia. *Endocrinology*, 140(12), 5894-5900.
 - ✓ Sharpe R. (1994) Regulation of spermatogenesis. *The Physiology of Reproduction*. In: Knobil E, Neill JD, editors. Vol. 1. New York: Raven;. pp. 1363–434
 - ✓ Shikina, S., & Yoshizaki, G. (2010). Improved in vitro culture conditions to enhance the survival, mitotic activity, and transplantability of rainbow trout type a spermatogonia. *Biology of reproduction*, 83(2), 268-276.

- ✓ Skinner MK, Fritz IB. (1985b) Androgen stimulation of Sertoli cell function is enhanced by peritubular cells. *Mol. Cell. Endocr.* 40: 115-122.
- ✓ Skinner MK., Fritz IB. (1985a) Testicular peritubular cells secrete a protein under androgen control that modulates Sertoli cell functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 114-118.
- ✓ Skinner MK., Griswold MD. (1980) Sertoli cells synthesis and secrete transferrin-like protein. *J. Biol. Chem.* 255: 9523-9525.
- ✓ Song, W., Zhu, H., Li, M., Li, N., Wu, J., Mu, H., ... & Hua, J. (2013). Promyelocytic leukaemia zinc finger maintains self-renewal of male germline stem cells (mGSCs) and its expression pattern in dairy goat testis. *Cell proliferation*, 46(4), 457-468.
- ✓ Spradling, A., Drummond-Barbosa, D., & Kai, T. (2001). Stem cells find their niche. *Nature*, 414(6859), 98-104.
- ✓ Stanley, H. F., Kadwell, M., & Wheeler, J. C. (1994). Molecular evolution of the family Camelidae: a mitochondrial DNA study. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 256(1345), 1-6.
- ✓ Steinberger A & Steinberger E. (1977). The Sertoli cell. In: Johnson AD & Gomes WR (ed). *The testis*, vol IV, Academic Press, NY, pp. 371-399.
- ✓ Steinberger A, Heindel JJ., Lindsey JN., Elkington JSH., Sanborn BM. Steinberger E. (1975) Isolation and culture of FSH responsive Sertoli cells. *Endocr. Res. Commun.* 2: 261-272.
- ✓ Steinberger A, Steinberger E. (1966) In vitro culture of rat testicular cells. *Exp. Cell Res.* 44: 443-451.
- ✓ Steinberger A, Steinberger E. (1967) Factors affecting spermatogenesis in organ culture of mammalian testis. *J. Reprod. Fert. [Suppl 2]*: 117-132.
- ✓ Steinberger A., Steinberger E. (1976) Secretion of an FSH inhibiting factor by cultured Sertoli cells. *Endocrinol.* 99: 918-921.
- ✓ Sumar, J. (1983). *Studies on reproductive pathology in alpacas*. SLU.

- ✓ Sumar, J., Bravo, P. W., & Foote, W. C. (1993). Sexual receptivity and time of ovulation in alpacas. *Small Ruminant Research*, 11(2), 143-150.
- ✓ Suzuki, H., Sada, A., Yoshida, S., & Saga, Y. (2009). The heterogeneity of spermatogonia is revealed by their topology and expression of marker proteins including the germ cell-specific proteins Nanos2 and Nanos3. *Developmental biology*, 336(2), 222-231.
- ✓ Sylvester SR. (1993). Secretion of transport and binding proteins. In: Griswold MD, Russell L (eds.), *The Sertoli Cell*. Clearwater, FL: Cache River Press.
- ✓ Tadokoro, Y., Yomogida, K., Ohta, H., Tohda, A., & Nishimune, Y. (2002). Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway. *Mechanisms of development*, 113(1), 29-39.
- ✓ Tajima, Y., Watanabe, D., Koshimizu, U., Matsuzawa, T., & Nishimune, Y. (1995). Insulin-like growth factor-I and transforming growth factor- α stimulate differentiation of type A spermatogonia in organ culture of adult mouse cryptorchid testes. *International journal of andrology*, 18(1), 8-12.
- ✓ Takashima, S., Kanatsu-Shinohara, M., Tanaka, T., Morimoto, H., Inoue, K., Ogonuki, N., ... & Shinohara, T. (2015). Functional differences between GDNF-dependent and FGF2-dependent mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Stem cell reports*, 4(3), 489-502.
- ✓ Takeichi, M., & Okada, T. S. (1972). Roles of magnesium and calcium ions in cell-to-substrate adhesion. *Experimental cell research*, 74(1), 51-60.
- ✓ Tindall DJ, Miller DA. Means AR. (1977) Characterization of androgen receptor in Sertoli cell-enriched testis. *Endocrinology*. 101: 13-23.
- ✓ Tindall DJ, Rowley DR. Lipschultz LI. (1983) Sertoli cell, structure and function in vivo and in vitro. In: *Infertility in the male*. (Eds. LI Lipshultz. SS Howards), Churchill Livingstone. N. Y., pp: 71-98.
- ✓ Tindall, D. J., Cheng, C. H., and Means, A. R. (1980) *Endocrinology* 106 (suppl), 148.

- ✓ Tokuda, M., Kadokawa, Y., Kurahashi, H., & Marunouchi, T. (2007). CDH1 is a specific marker for undifferentiated spermatogonia in mouse testes. *Biology of reproduction*, 76(1), 130-141.
- ✓ Tran, D., Picard, J. Y., Campargue, J. & Josso, N. (1987) Immunocytochemical detection of anti-Miillerian hormone in Sertoli cells of various mammalian species including human. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 35, 733-743.
- ✓ Tres LL. Kierszenbaum AL. (1963) Viability of rat spermatogenic cells in vitro is facilitated by coculture with Sertoli cells in serum-free hormone supplemented medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*80: 3377-3381.
- ✓ Tres LL. Smith EP, Van Uyk JJ, Kierszenbaum AL. (1986) Immunoreactive sites and accumulation of somatomedin-C in rat Sertoli-spermatogenic cell co-cultures. *Exp. Cell Res.* 162: 33-50.
- ✓ Valdivia, M., Castañeda-Zegarra, S., Lévano, G., Lazo, J., Reyes, J., Bravo, Z., Santiani, A., Mujica F., Ruiz J. & Gonzales, G. F. (2019b). Spermatogonial stem cells identified by molecular expression of PLZF, integrin β 1 and reactivity to *Dolichos biflorus agglutinin* in alpaca adult testes. *Andrologia*, 51(6), e13283.
- ✓ Valdivia, M., Reyes, J., Bravo, Z., Cancho, C., Castañeda, S., Limaymanta, O., Woll, P., Santiani, A. & Gonzales, G. F. (2019a). In vitro culture of spermatogonial stem cells isolated from adult alpaca (*Vicugna pacos*) testes analysed with *Dolichos biflorus* by flow cytometry. *Andrologia*, 51(6), e13269.
- ✓ Valli, H., Phillips, B. T., Orwig, K. E., Gassei, K., & Nagano, M. C. (2015). Spermatogonial stem cells and spermatogenesis. *Knobil and Neill's physiology of reproduction*, 1, 595-635.
- ✓ Valli, H., Sukhwani, M., Dovey, S. L., Peters, K. A., Donohue, J., Castro, C. A., ... & Orwig, K. E. (2014). Fluorescence-and magnetic-activated cell sorting strategies to isolate and enrich human spermatogonial stem cells. *Fertility and sterility*, 102(2), 566-580.
- ✓ van Bragt, M. P., Roepers-Gajadien, H. L., Korver, C. M., Bogerd, J., Okuda, A.,

- Eggen, B. J., ... & van Pelt, A. M. (2008). Expression of the pluripotency marker UTF1 is restricted to a subpopulation of early A spermatogonia in rat testis. *Reproduction*, 136(1), 33-40.
- ✓ Verini-Supplizi, A., Stradaoli, G., Fagioli, O., & Parillo, F. (2000). Localisation of the lectin reactive sites in adult and prepubertal horse testes. *Research in Veterinary Science*, 69(2), 113-118.
 - ✓ Vernon RG., Kopec B., Fritz IB. (1974) Observations on the binding of androgens by rat testis seminiferous tubules and testis extracts. *Mol. Cell. Endocr.* 1:167-187.
 - ✓ Viger, R. S., Mertineit, C., Trasler, J. M., & Nemer, M. (1998). Transcription factor GATA-4 is expressed in a sexually dimorphic pattern during mouse gonadal development and is a potent activator of the Mullerian inhibiting substance promoter. *Development*, 125(14), 2665-2675.
 - ✓ Vihko, K. K., Penttilä, T. L., Parvinen, M., & Belin, D. (1989). Regulation of urokinase-and tissue-type plasminogen activator gene expression in the rat seminiferous epithelium. *Molecular Endocrinology*, 3(1), 52-59.
 - ✓ Vincent-Fabert C, Platet N, Vandeveld A, Poplineau M, Koubi M, Finetti P, Tiberi G, Imbert A-M, Bertucci F, Duprez E (2016) PLZF mutation alters mouse hematopoietic stem cell function and cell cycle progression. *Blood* 127(15):1881–1885
 - ✓ Von Kopylow, K., Kirchhoff, C., Jezek, D., Schulze, W., Feig, C., Primig, M., ... & Spiess, A. N. (2010). Screening for biomarkers of spermatogonia within the human testis: a whole genome approach. *Human reproduction*, 25(5), 1104-1112.
 - ✓ Waheeb, R., & Hofmann, M. C. (2011). Human spermatogonial stem cells: a possible origin for spermatocytic seminoma. *International journal of andrology*, 34(4pt2), e296-e305.
 - ✓ Wang P, Suo L, Wang Y, Shang H, Li G, Hu J, Li Q (2014) Effects of GDNF and

LIF on mouse spermatogonial stem cells proliferation in vitro. *Cytotechnology* 66(2):309–316

- ✓ Wang, F. (2006). Culture of animal cells: a manual of basic technique. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 42(5), 169-169.
- ✓ Watanabe, I., & Okada, S. (1967). Effects of temperature on growth rate of cultured mammalian cells (L5178Y). *The Journal of cell biology*, 32(2), 309-323. doi:10.1083/jcb.32.2.309
- ✓ Weiss, L. (1986). Histología: biología celular y tisular. El Ateneo (ed) 5ta edición. Buenos Aires, Argentina (No. 576.7 HIS).
- ✓ Welsh, M. J., & Wiebe, J. P. (1975). Rat Sertoli cells: a rapid method for obtaining viable cells. *Endocrinology*, 96(3), 618-624
- ✓ Wheeler, P. R., Burkitt, H. G., & Daniels, V. G. (1979). *Functional histology. A text and colour atlas*. Churchill Livingstone, 23 Ravelston Terrace, Edinburgh EH4 3TL, pp 243-250.
- ✓ Wheeler, J. C. (1984). On the origin and early development of camelid pastoralism in the Andes. *Animals and archaeology*, 4, 1-13.
- ✓ Wheeler, J. C. (1995). Evolution and present situation of the South American Camelidae. *Biological Journal of the Linnean Society*, 54(3), 271-295.
- ✓ World Health Organization (WHO). "WHO Laboratory Manual for the examination and processing of human semen" Cambridge: Cambridge University. Fifth Edition (2010). http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547789_eng.pdf.
- ✓ Wrobel, K. H. (2000). Prespermatogenesis and spermatogoniogenesis in the bovine testis. *Anatomy and Embryology*, 202(3), 209-222.
- ✓ Wu, J., Song, W., Zhu, H., Niu, Z., Mu, H., Lei, A., ... & Hua, J. (2013). Enrichment and characterization of Thy1-positive male germline stem cells (mGSCs) from dairy goat (*Capra hircus*) testis using magnetic microbeads. *Theriogenology*, 80(9), 1052-1060.
- ✓ Wu, X., Goodyear, S. M., Tobias, J. W., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. (2011).

Spermatogonial stem cell self-renewal requires ETV5-mediated downstream activation of Brachyury in mice. *Biology of reproduction*, 85(6), 1114-1123.

- ✓ Xie, X., Nóbrega, R., & Pšenička, M. (2020). Spermatogonial Stem Cells in Fish: Characterization, Isolation, Enrichment, and Recent Advances of In Vitro Culture Systems. *Biomolecules*, 10(4), 644.
- ✓ Yao, T., & Asayama, Y. (2017). Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reproductive medicine and biology*, 16(2), 99-117.
- ✓ Yomogida, K., Yagura, Y., Tadokoro, Y., & Nishimune, Y. (2003). Dramatic expansion of germinal stem cells by ectopically expressed human glial cell line-derived neurotrophic factor in mouse Sertoli cells. *Biology of reproduction*, 69(4), 1303-1307.
- ✓ Yoshida, S., Sukeno, M., & Nabeshima, Y. I. (2007). A vasculature-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. *Science*, 317(5845), 1722-1726.
- ✓ Yoshida, S., Sukeno, M., Nakagawa, T., Ohbo, K., Nagamatsu, G., Suda, T., & Nabeshima, Y. I. (2006). The first round of mouse spermatogenesis is a distinctive program that lacks the self-renewing spermatogonia stage. *Development*, 133(8), 1495-1505.
- ✓ Zhang, R., Sun, J., & Zou, K. (2016). Advances in isolation methods for spermatogonial stem cells. *Stem cell reviews and reports*, 12(1), 15-25.
- ✓ Zhang, X., Ebata, K. T., Robaire, B., & Nagano, M. C. (2006). Aging of male germ line stem cells in mice. *Biology of reproduction*, 74(1), 119-124.
- ✓ Zhang, Z., Hill, J., Holland, M., Kurihara, Y., & Loveland, K. L. (2008). Bovine sertoli cells colonize and form tubules in murine hosts following transplantation and grafting procedures. *Journal of andrology*, 29(4), 418-430.
- ✓ Zheng Y, He Y, An J, Qin J, Wang Y, Zhang Y, Tian X & Zeng W. (2013a). THY1 is a surface marker of porcine gonocytes. *Reproduction, Fertility, and*

- ✓ Zheng, Y., Tian, X., Zhang, Y., Qin, J., An, J., & Zeng, W. (2013b). In vitro propagation of male germline stem cells from piglets. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 30(7), 945-952.
- ✓ Zheng, Y., Zhang, Y., Qu, R., He, Y., Tian, X., & Zeng, W. (2014). Spermatogonial stem cells from domestic animals: progress and prospects. *Reproduction*, 147(3), R65-R74.
- ✓ Zhu, H., Liu, C., Li, M., Sun, J., Song, W., & Hua, J. (2013). Optimization of the conditions of isolation and culture of dairy goat male germline stem cells (mGSC). *Animal reproduction science*, 137(1-2), 45-52.
- ✓ Zirkin BR, Awoniyi C, Griswold MD, Russell LD, Sharpe R. (1994) Is FSH required for adult spermatogenesis? *J Androl* 15:273-276

ANEXOS

Anexo 1: Procesamiento de las muestras biológicas

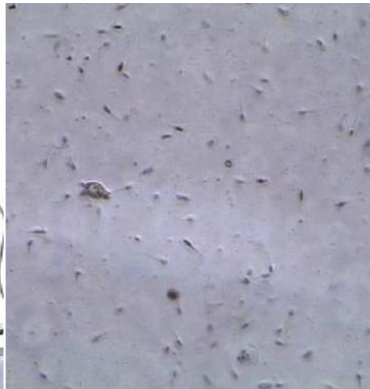
A. Evaluación de los parámetros espermáticos



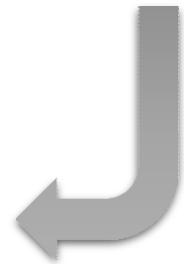
1. Limpieza de los testículos de alpaca



2. Procesamiento del epidídimo en medio HAM F10 para liberar los espermatozoides



3. Evaluación de los parámetros espermáticos vistos al microscopio



B. Aislamiento de las células madre espermato goniales (SSC) y células de Sertoli de alpaca



1. Liberación de la túnica albugínea de los testículos y cortes de 3 trozos para el aislamiento de SSC y 1 trozo para aislar las células de Sertoli



2. Adición de 3ml de medio MEM a 3 trozos (aislamiento de SSC) y 1ml de Hank's al trozo restante (aislamiento de células de Sertoli)



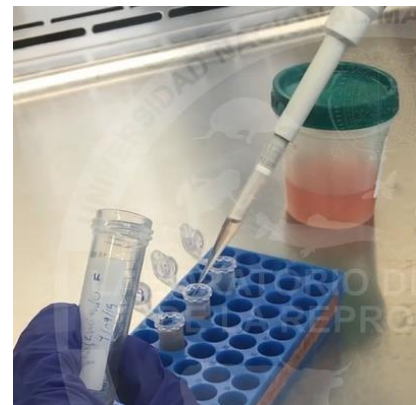
3. Liberación de los túbulos seminíferos mediante trituración de los trozos de tejido con tijeras



4. Recuperación de la suspensión de células testiculares



5. Centrifugación de las suspensiones celulares a 1500 rpm por 5 minutos y 37°C



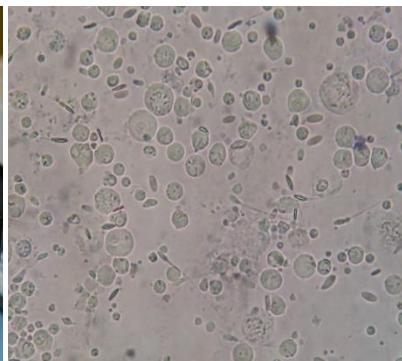
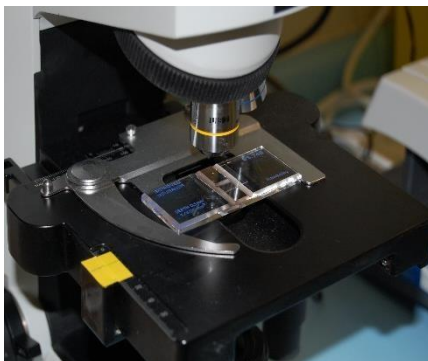
6. Lavado con el respectivo medio (MEM o solución de Hank's)



7. Digestiones enzimáticas: enzima 1 (colagenasa, hialuronidasa y DNasa) y enzima 2 (colagenasa y hialuronidasa) durante 30 y 20 minutos, respectivamente. Lavados con MEM o Hank's luego de cada digestión.



8. Obtención de las células testiculares



9. Evaluación de la concentración y viabilidad de las SSC de la suspensión de células testiculares

Anexo 2: Parámetros espermáticos de las 20 muestras testiculares evaluadas de alpaca (*Vicugna pacos*)

Muestras	Promedio peso testicular (g)	Concentración espermática [mill/ml]	Movilidad (%)	Vitalidad (%)	Test de Host (%)
97 - 19	9.47	72	39.87	60.72	54.38
100 - 19	8.26	81	40.1	61.24	60.84
127 - 19	16.45	83	49.15	66.34	66.56
129 - 19	14.29	92	38.52	35.83	40.98
131 - 19	14.89	120	58.53	64.55	37.89
5 - 20	18.67	269	68.07	75.14	69.96
14 - 20	16.68	450	47.11	64.46	53.46
20 - 20	15.79	242	45.94	77.82	75.00
22 - 20	13.74	403	81.13	62.66	73.11
24 - 20	14.55	395	51.13	55.79	65.27
30 - 20	14.96	381	57.91	72.03	63.90
35 - 20	12.66	40	39.24	80.60	78.86
37 - 20	13.29	322	57.08	70.59	66.92
38 - 20	13.33	217	57.51	73.91	65.71
44 - 20	17.86	398	60.66	77.81	70.77
45 - 20	17.55	184	24.66	40.63	47.98
46 - 20	14.26	211	67.58	74.45	91.83
52 - 20	12.49	205	71.24	84.46	72.60
56 - 20	11.01	64	47.00	61.19	56.98
57 - 20	15.23	234	52.46	70.29	67.76

* Los números 19 y 20 indican el año en el que se trabajó la muestra (2019-2020)

Anexo 3: Viabilidades y Concentraciones iniciales y post percoll de las células testiculares de los 20 pares de muestras trabajadas

Muestras	V	M	Viabilidad Inicial (%)	Concentración Inicial [mill/ml]	V	M	Viabilidad Post Percoll (%)	Concentración Post Percoll [mill/ml]
97- 19	228	9	96.2	14.0	218	4	98.2	10.8
100 - 19	206	7	96.7	123.0	269	24	91.8	8.4
127- 19	192	63	75.3	44.0	143	17	89.4	21.4
129 - 19	86	7	92.5	65.0	221	23	90.6	12.3
131 - 19	159	6	96.4	94.0	167	6	96.5	7.4
5 - 20	290	5	98.3	26.1	483	30	94.2	24,6
14 - 20	358	3	99.2	110.0	435	4	99.1	32,6
20 - 20	160	51	75.8	49.0	225	39	85.2	23,4
22 - 20	480	35	93.2	54.0	390	10	97.5	25,7
24 - 20	454	5	98.9	93.0	255	6	97.7	9,7
30 - 20	252	3	98.8	82.0	449	28	94.1	19.3
35 - 20	414	7	98.3	143.0	747	54	93.3	25.2
37 - 20	379	20	95.0	60.0	322	25	92.8	11.8
38 - 20	281	5	98.3	111.0	68	26	72.3	12.0
44 - 20	247	23	91.5	53.0	297	17	94.6	5.4
45 - 20	186	21	89.9	64.0	193	13	93.7	9.4
46 - 20	207	27	88.5	79.0	238	19	92.6	5.4
52 - 20	216	31	87.4	85.0	193	19	91.0	12.2
56 - 20	189	18	91.3	46.0	189	13	93.6	5.7
57 - 20	213	23	90.3	30.0	208	20	91.2	5.9

Anexo 4: Prueba de normalidad de viabilidades inicial y post percoll de los 20 pares de muestras testiculares de alpaca trabajados

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Viabilidad inicial (%)	,170	20	,133	,817	20	,002
Vitadlidad post percoll (%)	,223	20	,010	,775	20	,000

a. Corrección de significación de Lilliefors

$p < 0.05$, los grupos de estudio no cumplen distribución normal

Anexo 5: Estadístico de prueba Wilcoxon para demostrar si existe o no diferencia significativa entre las medias de la viabilidad inicial y post percoll

	Viabilidad post percoll (%) - Viabilidad inicial (%)
Z	-,261 ^b
Sig. asintótica(bilateral)	,794

a. Prueba de rangos con signo de Wilcoxon

b. Se basa en rangos negativos.

$p > 0.05$, no existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las viabilidades de las células redondas aisladas de las digestiones enzimáticas (viabilidad inicial) y las células enriquecidas por las gradientes de Percoll (viabilidad post percoll).

Anexo 6: Comparación de medias de las poblaciones celulares sDBA+, wDBA+ y DBA- entre los grupos Control y Post Percoll, usando Prueba T para muestras relacionadas - Evaluación por Citometría de Flujo

MUESTRAS	Grupo Control			Grupo Post percoll		
	% sDBA+	% wDBA+	% DBA-	% sDBA+	% wDBA+	% DBA-
5	36.10	52.30	11.60	79.90	18.94	1.06
20	85.30	12.50	2.20	91.11	7.68	0.21
22	23.00	62.30	4.70	52.61	46.80	0.59
97	2.23	83.14	14.63	23.69	65.30	9.91
100	4.57	82.30	13.13	3.64	69.10	27.20
127	33.24	37.40	24.19	75.30	19.89	1.22
129	71.00	24.26	4.74	95.91	3.17	0.42
131	40.70	55.80	2.96	77.49	18.33	1.08

Prueba de muestras emparejadas

	Diferencias emparejadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
				Inferior	Superior			
Par 1 sDBA+_C – sDBA+_P	-25,43875	16,28479	5,75754	-39,05317	-11,82433	-4,418	7	,003

p<0.05, existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de SSC del grupo Control (sDBA+_C) y Post Percoll (sDBA+_P)

Prueba de muestras emparejadas

	Diferencias emparejadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza				
				de la diferencia				
				Inferior	Superior			
Par 1 wDBA+ C – wDBA+ P	20,09875	10,64082	3,76210	11,20281	28,99469	5,342	7	,001

p<0.05, existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de SSC en diferenciación temprana del grupo Control (wDBA+_C) y Post Percoll (wDBA+_P)

Prueba de muestras emparejadas

	Diferencias emparejadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
				Inferior	Superior			
Par 1 DBA-_C – DBA-_P	4,55750	10,25279	3,62491	-4,01405	13,12905	1,257	7	,249

p>0.05, no existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las células diferenciadas del grupo Control (DBA-_C) y Post Percoll (DBA-_P)

Anexo 7: Comparación de medias de las poblaciones celulares sDBA+, wDBA+ y DBA- entre los grupos Control y Post Percoll, usando Prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas - Evaluación por Microscopía de Fluorescencia

MUESTRAS	Grupo Control			Grupo Post percoll		
	% sDBA+	% wDBA+	% DBA-	% sDBA+	% wDBA+	% DBA-
14	54.39	42.98	2.63	69.30	23.68	7.02
24	49.60	38.40	12.00	81.82	15.15	3.03
30	20.93	13.95	65.12	19.54	11.49	68.97
35	2.26	3.76	93.98	19.67	3.28	77.05
37	2.38	0.68	96.94	17.05	1.16	81.78
38	1.68	3.78	94.54	12.24	4.64	83.12
44	2.94	1.96	95.10	21.21	6.06	72.73
45	3.03	1.52	95.45	20.59	7.35	72.06
46	2.70	2.70	94.59	15.32	5.65	79.03
52	2.54	1.52	95.94	33.33	2.47	64.20
56	9.09	2.73	88.18	30.47	1.56	67.97
57	8.45	4.93	86.62	29.66	2.07	68.28

Estadísticos de prueba ^a	
	sDBA+ _P – sDBA+ _C
Z	-2,981 ^b
Sig. asintótica (bilateral)	,003

a. Prueba de rangos con signo de Wilcoxon

b. Se basa en rangos negativos.

$p < 0.05$, existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de SSC del grupo Control (sDBA+ _C) y Post Percoll (sDBA+ _P)

Estadísticos de prueba ^a	
	wDBA+ _P - wDBA+ _C
Z	-,275 ^b
Sig. asintótica (bilateral)	,784

a. Prueba de rangos con signo de Wilcoxon

b. Se basa en rangos positivos.

$p > 0.05$, no existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de SSC en diferenciación temprana del grupo Control (wDBA+ _C) y Post Percoll (wDBA+ _P)

Estadísticos de prueba ^a	
	DBA-_P – DBA-_C
Z	-2,824 ^b
Sig. asintótica (bilateral)	,005

a. Prueba de rangos con signo de Wilcoxon

b. Se basa en rangos positivos.

$p < 0.05$, existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las células diferenciadas del grupo Control (DBA-_C) y Post Percoll (DBA-_P)

Anexo 8: Comparación de medias de las poblaciones celulares sDBA+, wDBA+ y DBA- entre los grupos Cultivo Control 8d y Cultivo Post Percoll 8d, usando Prueba T para muestras relacionadas - Evaluación por Citometría de Flujo

MUESTRAS	Grupo Cultivo Control 8d			Grupo Cultivo Post Percoll 8d		
	% sDBA+	% wDBA+	% DBA-	% sDBA+	% wDBA+	% DBA-
5C8D	84.60	12.80	0.09	34.10	54.50	4.64
20C8D	53.70	28.80	3.90	40.30	40.90	12.90
22C8D	35.00	57.13	7.87	49.11	47.63	3.26
97C8D	20.20	65.80	14.00	59.69	35.30	5.01
100C8D	51.70	42.20	5.00	52.10	39.30	7.80
127C8D	33.20	58.30	2.26	81.20	16.70	0.37
129C8D	47.20	44.40	5.43	61.20	30.60	2.29
131C8D	32.80	48.60	1.47	47.60	50.60	1.88

Prueba de muestras emparejadas								
	Diferencias emparejadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
				Inferior	Superior			
Par 1 sDBA+_CC – sDBA+ CP	-8,36250	30,81769	10,89570	-34,12674	17,40174	-,768	7	,468

$p > 0.05$, no existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las SSC del grupo Cultivo Control 8d (sDBA+_CC) y Cultivo Post Percoll 8d (sDBA+_CP)

Prueba de muestras emparejadas

	Diferencias emparejadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
				Inferior	Superior			
Par 1 wDBA+_CC – wDBA+_CP	5,31250	25,67219	9,07649	-16,14999	26,77499	,585	7	,577

$p > 0.05$, no existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de SSC en diferenciación temprana del grupo Cultivo Control 8d (wDBA+_CC) y Cultivo Post Percoll 8d (wDBA+_CP)

Prueba de muestras emparejadas

	Diferencias emparejadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
				Inferior	Superior			
Par 1 DBA-_CC – DBA-_CP	,23375	5,66666	2,00347	-4,50370	4,97120	,117	7	,910

$p > 0.05$, no existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las células diferenciadas del grupo Cultivo Control 8d (DBA-_CC) y Cultivo Post Percoll 8d (DBA-_CP)

Anexo 9: Comparación de medias de las poblaciones celulares sDBA+, wDBA+ y DBA- entre los grupos Cultivo Control 8d y Cultivo Post Percoll 8d, usando Prueba T y Prueba de Wilcoxon - Evaluación por Microscopía de Fluorescencia

MUESTRAS	Grupo Cultivo Control 8d			Grupo Cultivo Post Percoll 8d		
	% sDBA+	% wDBA+	% DBA-	% sDBA+	% wDBA+	% DBA-
14C8D	60.00	26.96	13.04	64.79	28.17	7.04
24C8D	37.35	21.69	40.96	58.02	24.69	17.28
30C8D	47.46	31.95	20.59	59.6	30.25	10.15
35C8D	40.01	18.88	41.11	49.15	30.75	20.10
37C8D	65.00	30.00	5.00	72.94	17.65	9.41
38C8D	50.00	41.67	8.33	70.00	26.00	4.00
44C8D	45.45	37.88	16.67	54.9	39.22	5.88
45C8D	51.89	32.08	16.04	57.79	36.18	6.03
46C8D	50.00	46.55	3.45	55.88	39.41	4.71
52C8D	48.84	44.19	6.98	65.19	31.11	3.70
56C8D	48.37	44.02	7.61	51.59	43.95	4.46
57C8D	59.89	36.36	3.74	65.69	30.88	3.43

Prueba de muestras emparejadas

	Diferencias emparejadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
				Inferior	Superior			
Par 1 sDBA+_CC – sDBA+_CP	-10,10667	5,94243	1,71543	-13,88231	-6,33103	-5,892	11	,000

$p < 0.05$, existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las SSC del grupo Cultivo Control 8d (sDBA+_CC) y Cultivo Post Percoll 8d (sDBA+_CP)

Prueba de muestras emparejadas

	Diferencias emparejadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
				Inferior	Superior			
Par 1 wDBA+_CC – wDBA+_CP	2,83083	8,12888	2,34661	-2,33401	7,99568	1,206	11	,253

$p > 0.05$, no existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de SSC en diferenciación temprana del grupo Cultivo Control 8d (wDBA+_CC) y Cultivo Post Percoll 8d (wDBA+_CP)

Estadísticos de prueba ^a	
	DBA-_CP – DBA-_CC
Z	-2,432 ^b
Sig. asintótica (bilateral)	,015

a. Prueba de rangos con signo de Wilcoxon

b. Se basa en rangos positivos.

$p < 0.05$, existe diferencia significativa entre las medias de las células diferenciadas del grupo Cultivo Control 8d (DBA-_CC) y Cultivo Post Percoll 8d (DBA-_CP)

Anexo 10: Comparación de medias de las poblaciones celulares sDBA+ entre los grupos Control vs Cultivo Control 8d y Percoll vs Cultivo Post Percoll 8d - Evaluación por Citometría de Flujo

Prueba de muestras emparejadas									
		Diferencias emparejadas					t	gl	Sig. (bilateral)
		Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 1	sDBA+_C – sDBA+_ CC	-7,78250	29,72080	10,50789	-32,62971	17,06471	-,741	7	,483

$p > 0.05$, no existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las SSC del grupo Control (sDBA+_C) y Cultivo Control 8d (sDBA+_CC)

Prueba de muestras emparejadas									
		Diferencias emparejadas					t	gl	Sig.
		Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				(bilateral)
					Inferior	Superior			
Par 1	sDBA+ _P – sDBA+ _CP	9,29375	37,37443	13,21385	-21,95205	40,53955	,703	7	,505

$p > 0.05$, no existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las SSC del grupo Percoll (sDBA+_P) y Cultivo Post Percoll 8d (sDBA+_CP)

Anexo 11: Comparación de medias de las poblaciones celulares sDBA+ entre los grupos Control vs Cultivo Control 8d y Percoll vs Cultivo Post Percoll 8d - Evaluación por Microscopía de Fluorescencia

Prueba de muestras emparejadas									
		Diferencias emparejadas					t	gl	Sig. (bilateral)
		Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 1	sDBA+_C – sDBA+_CC	-37,02250	21,06896	6,08208	-50,40908	-23,63592	-6,087	11	,000

$p < 0.05$, sí existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las SSC del grupo Control (sDBA+_C) y Cultivo Control 8d (sDBA+_CC)

Prueba de muestras emparejadas								
	Diferencias emparejadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
				Inferior	Superior			
Par 1 sDBA+_P – sDBA+_CP	-29,61167	23,20188	6,69781	-44,35344	-14,86990	-4,421	11	,001

$p < 0.05$, sí existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las SSC del grupo Percoll (sDBA+_P) y Cultivo Post Percoll 8d (sDBA+_CP)